

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT
ANNÉE 1930

N° 64

THÈSE
POUR LE
DOCTORAT VÉTÉRINAIRE
(Diplôme d'État)

soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1930

PAR

ALBERT BOURDIN

Né le 20 Juin 1895, à Romilly-sur-Seine (Aube)

RECHERCHES SUR L'HEMOLYSINE
DU
STREPTOCOQUE GOURMEUX

JURY

M. A. LEMIERRE, Professeur à la Faculté de Médecine :	Président
M. PANISSET, Prof. à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort	} Assesseurs
M. VERGE	

PARIS (V^e)

LES PRESSES UNIVERSITAIRES DE FRANCE

49, boulevard Saint-Michel, 49

1930

RECHERCHES SUR L'HÉMOLYSINE
DU
STREPTOCOQUE GOURMEUX



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551827_0007

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(Diplôme d'État)

soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1930

PAR

ALBERT BOURDIN

Né le 20 Juin 1895, à Ramilly-sur-Seine (Aube)

RECHERCHES SUR L'HEMOLYSINE

DU

STREPTOCOQUE GOURMEUX

JURY

M. A. LEMIERRE, Professeur à la Faculté de Médecine :	Président
M. PANISSET, Prof. à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort :	} Assesseurs
M. VERGE	

PARIS (V°)

LES PRESSES UNIVERSITAIRES DE FRANCE

49, boulevard Saint-Michel, 49

1930



Personnel Enseignant de l'École Vétérinaire d'Alfort

Directeurs honoraires : MM. P.-J. CADIOT et H. VALLEE.

Directeur : M. E. NICOLAS.

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général honoraire des Ecoles Vétérinaires; P.-J. CADIOT, A. H. VALLEE.

Professeurs et chargés de cours

	MM.
Anatomie descriptive des animaux domestiques.	BRESSOU.
Physiologie, Thérapeutique générale.	MAIGNON.
Physique et Chimie médicales, Toxicologie, Pharmacie.	NICOLAS.
Parasitologie et Maladies parasitaires, Clinique; Zoologie.	HENRY.
Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, Clinique; Sémiologie et Propédeutique, Jurisprudence.	ROBIN.
Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, Clinique; Anatomie chirurgicale. Médecine opératoire et Ferrure.	COQUOT.
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, Clinique; Médecine opératoire, Obstétrique.	LESBOUYRIES.
Pathologie générale et Microbiologie, Maladies microbiennes et Police sanitaire, Clinique.	PANISSET.
Histologie et Embryologie, Anatomie pathologique; Autopsies.	PETIT.
Zootéchnie et Economie rurale.	DECHAMBRE.
Agronomie, Botanique et Hygiène; Matière médicale.	DECHAMBRE. HENRY.
Industrie et contrôle des produits d'origine animale.	VERGE.

Professeur agrégé : M. LESBOUYRIES.

Chef de travaux agrégé : M. SIMONNET.

Chefs de travaux : MM. MONVOISIN et MOUSSU (R.).

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation, ni improbation.

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MON BEAU-PERE

M. le Vétérinaire Général de l'Armée FONTAINE

Docteur en Médecine.

Hommage de filial dévouement.

A MA FAMILLE

Témoignage de profonde affection.

*A Messieurs COMAR
qui, selon la tradition des Laboratoires Clin,
entretiennent un véritable foyer de recherches
et de réalisations scientifiques.*

*Témoignages de respectueuse gratitude
pour les encouragements si précieux et si désintéressés
qu'ils m'ont prodigués.*

A M. le Professeur VINCENT

Professeur au Collège de France,
Membre de l'Institut,
Membre de l'Académie de Médecine,

*pour l'orientation scientifique qu'il a bien voulu donner
à mon activité lors de mon passage au Laboratoire
de Sérothérapie de l'Armée et pour la bienveil-
lance qu'il n'a cessé depuis de me témoigner.
Hommage de très respectueux attachement.*

A M. le Vétérinaire Commandant URBAIN

Directeur du Laboratoire Militaire de Recherches Vétérinaires

*qui a inspiré ce travail et m'a aidé
de ses précieux conseils.
Témoignage de profonde reconnaissance.*

A mon Président de thèse

M. le Professeur LEMIERRE

Professeur de Bactériologie à la Faculté de Médecine de Paris,
Médecin de l'Hôpital Bichat,

*pour le très grand honneur qu'il m'a fait
en acceptant de présider cette thèse.*

A mon maître

M. le Professeur PANISSET

*qui a guidé mes premiers pas dans les études
bactériologiques et m'a toujours témoigné
sa bienveillante sympathie.
Hommage de reconnaissance.*

A M. le Professeur VERGE.

Respectueux hommage.

AVANT-PROPOS

Le point de départ de ces recherches est un travail allemand de 1923 dans lequel les auteurs (MEYER et JOSEPH), après avoir exposé toute l'importance qu'ils attachent aux hémotoxines du streptocoque dans les streptococcies humaines, annoncent l'obtention chez le cheval d'un sérum à la fois antibactérien en antihémotoxique, cette dernière propriété étant titrable facilement *in vitro*.

Ce résultat de l'obtention d'antihémolysines chez le cheval n'était acquis que par une sélection de races de streptocoques très fortement hémolytiques, une technique particulière de leur culture *in vitro* (technique sur laquelle les auteurs ne donnent d'ailleurs aucune indication) et l'inoculation au cheval, par voie sous-cutanée, de doses hémotoxiques lentement et progressivement croissantes.

Nous pouvons dire déjà que ces résultats s'opposent à ceux de la plupart des savants qui se sont occupés de sérothérapie antistreptococcique et qui s'accordent à reconnaître que le sérum antistreptococcique préparé chez le cheval, comme sur d'autres animaux d'expériences, ne contient pas d'antihémolysine.

Nous avons pensé que le sérum antistreptococcique gourmeux se prêtait mieux qu'aucun autre à des recherches sur les antihémolysines parce que : 1° le streptocoque gourmeux est toujours hémolytique; BROcq-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN font même de cette propriété un signe distinctif d'espèce parmi les streptocoques équins; 2° le sérum antistreptococcique gourmeux est préparé chez le cheval, espèce naturellement sensible au microorganisme en question.

Mais avant d'aborder l'étude de l'antihémolysine, il nous a fallu obtenir des hémolysines actives et préciser dans quelles conditions de culture artificielle ces toxines se dé-

veloppaient au mieux : ce sera l'objet de la première partie de notre travail.

Nous devons à M. le Vétérinaire-Commandant URBAIN, Directeur du Laboratoire militaire de Recherches Vétérinaires, l'inspiration de ce travail, les plus précieux conseils, ainsi que les souches de streptocoques gourmeux et les sérums antigourmeux; qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos très vifs remerciements.

Nos recherches n'ont été possibles que grâce aux moyens matériels mis généreusement à notre disposition par MM. COMAR dans leurs Laboratoires de Sérologie; nous leur en sommes profondément reconnaissants.

INTRODUCTION

Par hémolyse, il faut entendre la mise en liberté dans le milieu liquide ambiant, de l'hémoglobine normalement fixée sur les globules rouges sanguins. Ce phénomène est obligatoirement le témoin de l'altération subie par le globule et pour essayer d'en pénétrer le mécanisme, il faut d'abord connaître la structure intime et la composition chimique de l'hématie.

On sait qu'un globule rouge est formé d'un stroma de nature spongieuse dans les mailles duquel est emprisonnée une masse demi-solide de couleur rouge, l'hémoglobine, le tout entouré d'une mince membrane lipoïdique semi-perméable.

Au point de vue chimique, hémoglobine mise à part, le globule rouge est composé de substances protéiques (nucléoprotéides et nucléalbumines) pour les $\frac{2}{3}$ et pour $\frac{1}{3}$ de substances lipidiques (cholestérine, lécithine, cérébrosides) avec 1 p. 100 de sels minéraux.

Le moyen le plus simple de provoquer l'hémolyse consiste à mettre le globule dans une solution hypotonique au sérum sanguin (eau distillée, par exemple) : par osmose, l'hémoglobine passe dans l'eau. Mais l'hémolyse est encore réalisée par diverses substances chimiques : l'éther qui dissout les lipoïdes, des glucosides (saponine), des savons (oléate de sodium), les sels biliaires, les acides et alcalis même très dilués; beaucoup de ces corps agissent en modifiant la perméabilité de la membrane. Enfin, certains produits de sécrétion ou d'élimination des organismes vivants végétaux et animaux, mal définis chimiquement, sont doués aussi de pouvoir hémolytique : poisons végétaux (ricine, abrine, crotine, phalline), poisons microbiens (un très grand nombre d'espèces microbiennes sécrètent ces poisons du sang : staphylocoque, pneumocoque, *m. meli-*

tensis, vibriion cholérique, *b. proteus*, *b. megatherium*, bactérie charbonneuse, *b. tétanique*, *b. de la peste*, *b. pyocyanique*, *b. coli*, *b. typiques*, dysentériques, du choléra aviaire, de la diphtérie, anaérobies de la gangrène, etc...), poisons animaux (venins de serpents, d'abeille, sérums d'animaux plus élevés en organisation, soit que ces sérums possèdent naturellement le pouvoir de détruire les globules rouges d'une espèce différente, soit que l'immunisation ait développé pareille propriété : immunhémolysine du sérum de lapin ou de cheval inoculés à répétition avec des globules de mouton, qui a trouvé son application dans la réaction de BORDET-GENGOU).

A quelle classe de ces hémolysines appartient l'hémolysine streptococcique? A priori, elle trouve sa place à côté de la staphylolysine dans le groupe des hémotoxines bactériennes et cependant elle se distingue nettement de ces dernières, comme nous le verrons, par le fait que son pouvoir antigène n'est pas indiscutablement établi; aussi est-on obligé de reconnaître avec PRIBRAM que la « nature hémotoxique de l'hémolysine streptococcique est douteuse, quoique vraisemblable ».

Quant au mécanisme d'action des hémolysines en général et des hémotoxines en particulier, il est encore mal connu, mais on est certain qu'il n'est pas unique, chaque hémolysine ayant des moyens particuliers de destruction du globule rouge. Les unes s'attaquent surtout à la membrane lipoïdique, d'autres au stroma globulaire; certaines, comme la staphylolysine agissent sur les protéines, d'autres comme la tétanolysine, sur les lipides.

CHAPITRE PREMIER

DE L'HÉMOLYSINE STREPTOCOCCIQUE

1° Aperçu historique

Avant 1901, l'existence de l'hémolysine streptococcique a été seulement pressentie par différents auteurs à l'examen des lésions provoquées chez l'animal d'expériences par l'inoculation de doses mortelles de cultures de streptocoques et en particulier de l'aspect laqué du sang du cœur : KNORR (1893), MARMOREK (1895), BORDET (1897), VON LINGELSHEIM (1899) qui réalisa même le laquage du sang *in vitro*.

L'étude *in vitro* par ERLICH (1898) et MADSEN (1899) de l'hémolysine tétanique ouvrit la voie à des recherches analogues pour d'autres hémolysines microbiennes; KRAUSS et CLAIRMONT (1900) étudient de ce point de vue : vibrions, staphylocoques, *proteus*; NEISS'ER et WECHSBERG (1901) : staphylocoques; et c'est ainsi que la même année (1901), BESREDKA en France et LUBENAU en Allemagne, publièrent les premières expériences sur l'hémolysine streptococcique. Les travaux de BESREDKA, en particulier, sur la streptococcolysine sont restés classiques et il faut bien reconnaître que les publications ultérieures sur la question n'apportèrent que peu de connaissances nouvelles.

Parmi ces publications, les unes visent les conditions de production de l'hémolysine et ses propriétés *in vitro* : SCHLESINGER (1903), RUEDIGER (1903), KERNER (1905), MAC LEOD (1912), BRAUN (1912), VON HELLENS (1912), DE KRUIF et IRELAND (1920), MEADER et ROBINSON (1920), UMENO (1925), GORDON (1927), CESARI, COTONI et LAVALLE (1927).

d'autres s'occupent particulièrement de la relation

entre le pouvoir hémolytique et le pouvoir pathogène; SCHLESINGER (1903), ZANGEMEISTER (1909), JUPILLE (1911);

d'autres étudient les effets de l'hémolysine sur l'animal vivant : BRETON (1903), RUEDIGER (1903), TCHITCHKINE (1906), MAC LEOD et MAC NEE (1913), HALLENBERGER (1918), PULVERTAFT (1929);

d'autres essayent de classer les streptocoques d'après leurs propriétés hémolytiques : SCHOTTMÜLLER (1903), BARNES (1919);

d'autres tentent de pénétrer le mécanisme d'action et la nature de l'hémolysine : MEADER et ROBINSON (1920), WOLLMAN et GRAVES (1924), GORDON et STANSFIELD (1929).

Un certain nombre de ces auteurs étudient en même temps les antihémolysines streptococciques : BESREDKA (1901), MAC LEOD (1912), MAC LEOD et MAC NEE (1913), VON HELLENS (1913), BRAUN (1912), CESARI, COTONI et LAVALLE (1927).

Naturellement, tous ces travaux se rapportent aux streptocoques les plus divers de l'homme et des animaux. Au contraire, BROcq-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN (1924) étudient spécialement le streptocoque de la gourme du cheval et, dans leur importante monographie, un paragraphe est consacré à l'hémolysine de ce germe (p. 51); on y trouve en particulier que : *a*) les streptocoques gourmeux possèdent un pouvoir hémolytique marqué sur les trois espèces globulaires : cheval, mouton, cobaye, avec cependant une action plus intense sur les globules de cheval; *b*) les streptocoques équina non gourmeux et les streptocoques des autres animaux n'ont pas ce pouvoir hémolytique.

2° Choix d'une méthode de mise en évidence et de titrage

A. — Milieux solides

Le moyen le plus simple pour la mise en évidence de l'hémolysine d'un streptocoque consiste à cultiver ce germe sur gélose au sang. On procède de la façon suivante :

La gélose nutritive ordinaire contenue à raison de 8

à 10 cc. dans un tube à essais est liquéfiée au bain-marie à 100°, puis refroidie à 45°; on y incorpore intimement alors 1 cc. de sang défibriné, frais, de cheval et, sans laisser refroidir, on coule en boîte de Petri de 9 cm. de diamètre, en couche mince et uniforme, et sous le couvert de l'asepsie. On laisse au milieu le temps de se solidifier complètement par refroidissement et on l'ensemence à l'ose étroite avec la souche du streptocoque supposé hémolytique; on fait dessiner à l'ose, à la surface de la gélose, un quadrillage aussi régulier que possible de façon à étaler au maximum la gouttelette emportée par l'ose. On place à l'étuve à 37°, en retournant la boîte face ensemencée regardant vers le bas.

En procédant ainsi, on a toutes chances d'obtenir après 24 heures, des colonies suffisamment isolées autour desquelles se dessinent nettement, si le germe est hémolytique, des zones de diffusion de l'hémolysine sous forme de plages entièrement décolorées se détachant en clair sur le fond rouge du milieu non attaqué. Au niveau de ces plages, en effet, les hématies auront été lysées par les produits solubles issus des germes en développement.

C'est d'après l'aspect particulier de leurs colonies cultivées sur des plaques de gélose au sang (5 cc. de gélose et 2 cc. de sang humain) que SCHOTTMÜLLER (1903) put distinguer différentes variétés de streptocoques : le *str. longus* donnant en 12 à 18 heures à 37° de belles colonies arrondies entourées d'un anneau décoloré par la résorption complète de l'hémoglobine dans un rayon de 2 à 3 ^m/_m; le *str. viridans* qui donne en 24 heures de très belles colonies gris-noirâtres sans anneau hémolytique; le *str. mucosus* qui apparaît en colonies glaireuses gris-verdâtres devenant mates et sèches en 48 heures (on a démontré depuis que ce streptocoque n'est autre que le pneumocoque du type III). Par le même moyen, SCHOTTMÜLLER différencie des types streptococciques précédents, les colonies plates, brillantes, sans anneau hémolytique du pneumocoque.

Les travaux de SCHOTTMÜLLER devaient être repris par différents auteurs visant aussi bien une classification des streptocoques que la différenciation de ces germes avec les pneumocoques en se basant toujours sur l'aspect des cultures sur gélose au sang : BOXER (1906) ne put, ni distinguer les types établis par SCHOTTMÜLLER, ni établir de rela-

tions entre la provenance et l'aspect sur gélose au sang; BAUMANN (1906), BEITZKE et ROSENTHAL (1906), HECHT et HULLES (1909), BONDY (1909) s'élèvent également contre les conclusions de SCHOTTMÜLLER.

RUEDIGER (1906) sur gélose peptonée sucrée enrichie de 0 cc. 3 à 0 cc. 4 de sang défibriné de lapin, par tube, THALLMANN (1910) sur gélose additionnée de 5 gouttes de sang humain, DE KRUIF et IRELAND (1920) sur des plaques garnies de : sérum 20 %, globules rouges de mouton 5 %, gélose 75 %, BIELING (1921) sur la gélose de SCHOTTMÜLLER, étudient à leur tour streptocoques et pneumocoques et arrivent à des conclusions souvent divergentes.

Ces résultats s'éclairent par les études de BROWN (1919) qui montre que les variations de composition des milieux solides au sang et les conditions de culture suffisent à faire cataloguer hémolytique ou non hémolytique la même souche de streptocoques. Nous en concluons que d'une façon générale les milieux solides se prêtent mal à l'étude de l'hémolysine streptococcique.

Cependant, les conditions de culture exposées en tête de ce chapitre nous ont toujours permis de constater sans ambiguïté le caractère hémolytique de tous les streptocoques gourmeux que nous avons eus entre les mains, le halo décoloré de 3 à 4 ^m/_m de diamètre n'ayant jamais fait défaut dans une culture de 24 heures, halo entourant chacune des petites colonies grises, exactement arrondies, légèrement bombées et très réfringentes.

Mais il est bien certain qu'un pareil milieu ne saurait convenir au titrage du pouvoir hémolytique des différentes souches, non plus qu'à l'étude des conditions de production de l'hémolysine parce qu'il ne donne, comme terme de comparaison, que le diamètre de la plage décolorée. Pour de telles recherches, il faut nécessairement recourir aux milieux liquides.

A signaler toutefois que sur gélose au sang, UMEMO (1926) a pu étudier l'influence de la concentration en ions H du milieu sur le développement du streptocoque gourmeux du cheval et constater que les dimensions du halo augmentent avec le pH dans certaines limites : plus petit sur milieu acide que sur milieu alcalin; l'alcalinité optima s'étendant de pH 7,5 à pH 7,8.

B. — Milieux liquides

Les procédés utilisés pour la démonstration de l'hémolyse en milieu liquide peuvent se ramener à deux techniques. Dans la première, inspirée directement de l'usage des milieux solides précédemment décrits, le sang ou les hématies sont incorporés au milieu nutritif avant l'ensemencement; dans la seconde, inspirée du titrage des toxines en général, on étudie l'action de l'hémolysine d'une culture déjà développée, sur des globules préparés.

C'est à la première technique que se rapporte le procédé employé par VON LINGELSHIM dès 1899; il ensemence du sang d'un animal sensible au streptocoque et constate l'hémolyse après quelques heures d'étuve; même résultat en mélangeant au sang citraté un demi volume de bouillon. Des procédés très voisins sont employés par MARMOREK (1902), SCHOTTMÜLLER (1903), ZANGEMEISTER (1909). KERNER (1905) ajoute au bouillon au lieu de sang total, des hématies lavées de lapin et mesure le degré d'hémolyse à la hauteur à laquelle l'hémoglobine libérée s'élève dans le milieu.

Quand on ensemence le streptocoque gourmeux dans du bouillon ordinaire additionné de sang, l'aspect est différent suivant la quantité de sang ajouté. Dans un premier tube qui servira de témoin, nous ajoutons simplement au bouillon une goutte de sang défibriné et stérile de cheval; dans un second, nous ajoutons également une goutte de sang; dans un troisième, nous ajoutons 5 gouttes de sang et nous ensemençons les deux derniers avec 2 ou 3 gouttes de culture jeune de streptocoque gourmeux. Après 12 heures de séjour à l'étuve à 37°, voici ce qu'on observe : dans le tube témoin, le bouillon est redevenu parfaitement limpide et n'a pas changé de teinte; un culot de globules rouges est tassé dans le fond du tube. Dans le second tube, on note un trouble uniforme et une teinte légère, uniforme, bordeaux; pas le moindre culot globulaire. Dans le troisième tube, il n'y a pas de culot de globules, mais une teinte rouge foncé dégradée de bas en haut qui s'élève à 3 c/m et au-dessus de laquelle le bouillon est trouble et à peine teinté de rouge-bordeaux; cet aspect différent est dû simplement à ce que le volume du sang étant considérable, le culot globulaire a eu le temps de se rassembler avant de

subir la lyse qui a fini cependant par s'opérer complète comme dans le deuxième tube.

Cette technique, comme celle des milieux solides, permet sans doute de mettre en évidence les propriétés hémolytiques d'une souche, mais elle ne permet ni l'étude détaillée de ces propriétés, ni leur mesure même approximative; elle est à abandonner.

Parmi les procédés inspirés des méthodes de titrage des toxines en général, s'inscrit, premier en date (1901), le travail de BESREDKA sur la streptocolysine (le savant auteur désigne ainsi le filtrat sur bougie Chamberland d'une culture de 24 heures à 37° obtenue en ensemençant, en sérum de lapin chauffé à 55°, 1 ou 2 gouttes de sang de lapin mourant de streptococcie); le titrage se fait, comme celui de l'hémolysine cellulaire, en mettant en présence, dans une série de tubes à hémolyse, une quantité fixe de sang défibriné de lapin et des doses progressives de filtrat; lecture après 2 heures à l'étuve à 37° : 12 gouttes de streptocolysine dissolvent complètement 1 goutte de sang de lapin.

JUPILLE (1911) emploie comme milieu de culture un mélange à parties égales de bouillon et de sérum chauffé (56°) de cheval; il titre la culture totale ou le filtrat contre 0 cc. 5 d'émulsion à 5 % de globules lavés de lapin.

SCHLESINGER (1903) cultive le streptocoque en bouillon et, sans filtrer, titre avec 1 goutte de sang défibriné de lapin.

BRAUN (1912) ensemeence en bouillon additionné de 1/10° de sérum chauffé de lapin; il filtre et titre en se servant de 1/2 cc. d'une émulsion à 5 % d'hématies de lapin.

MAC LEOD (1912) emploie un milieu composé de 15 à 20 % de sérum chauffé de cheval et de 80 % de bouillon peptoné nettement alcalin au tournesol; il filtre sa culture sur filtres MAASSEN et DOULTON; il titre contre 1 cc. d'émulsion à 5 % d'hématies de bœuf et lit le résultat après 2 h. à 37°; il trouve des doses minima hémolytiques descendant jusqu'à 0 cc. 02 et 0 cc. 0075.

MAC LEOD et MAC NEE (1913) ajoutent à un bouillon de bœuf deux fois plus concentré que le bouillon ordinaire, 20 à 25 % de sérum frais de cheval, chauffé à 57°; ils fil-

trent la culture de 18 heures sur bougie MAASSEN; le titrage se fait dans les mêmes conditions que précédemment.

VON HELLENS (1913) emploie un mélange à parties égales de bouillon et de sérum de cheval chauffé, et constate que le liquide d'ascite inactivé et le sérum de lapin conviennent moins bien, mais mieux toutefois que le bouillon simple. Pour le titrage du pouvoir hémolytique, 8 cc. d'émulsion à 0,5 % d'hématies lavées de cheval sont mélangés à 2 cc. de culture ou de filtrat à des dilutions diverses; la lecture des résultats est faite après 2 heures à l'étuve à 37°, plus une nuit à la glacière.

DE KRUIF et IRELAND (1920) recherchent l'hémolysine dans la culture centrifugée plutôt que dans la culture totale ou le filtrat.

BROCQ-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN (1925) utilisent la technique de BESREDKA en la simplifiant; au lieu de partir du sang du cœur d'un lapin tué par une injection virulente de streptocoque, ils ensemencent du sérum de lapin préalablement chauffé 30 minutes à 55° avec une culture de streptocoques en bouillon-sérum âgée de 24 heures. Le pouvoir hémolytique du filtrat est recherché en le faisant agir à des doses croissantes sur 0 cc. 5 d'une dilution de globules de cheval, de mouton, de cobaye préalablement lavés et émulsionnés à raison de 1 pour 20 dans de l'eau physiologique à 9 pour 1.000. On porte ensuite à l'étuve à 37° jusqu'à apparition de l'hémolyse.

LAVALLE (1927) se sert comme milieu de culture de bouillon Martin additionné de 1/10 de sérum équin non chauffé; il titre le pouvoir hémolytique de la culture totale développée à 37° en mettant au contact de 1 cc. d'émulsion de globules de mouton à 10 %, des quantités décroissantes de culture mesurées en gouttes; il complète avec du milieu de culture stérile, met au bain-marie à 35° et fait la lecture au bout d'une heure.

Nous avons comparé dans le détail tous ces procédés et après divers tâtonnements, nous nous sommes arrêté pour le titrage du pouvoir hémolytique de nos streptocoques gourmeux à la technique suivante :

La souche à étudier conservée, comme le recommandent BROCQ-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN, en ampoules scellées où elles gardent au mieux vitalité, virulence et pouvoir hémolytique, est rajeunie par passage de 10 à 12 h.

à 37° en bouillon Martin additionné de sérum de cheval non chauffé (1 partie de sérum pour 9 de bouillon). 5 gouttes de cette culture sont alors repiquées dans 10 cc. d'un milieu composé de bouillon Martin 6 parties, sérum non chauffé de cheval 4 parties (40 % de sérum).

Le titrage de l'hémolysine se fait dans la culture débarrassée de ses germes de façon élémentaire quoique presque parfaite par centrifugation à grande vitesse (1/2 heure, 5.000 tours-minute) en procédant de la façon suivante :

Dans une série de tubes à hémolyse, on dépose une quantité fixe : 1 cc. d'une émulsion à 10 % en sérum physiologique d'hématies de cheval fraîches (moins de 8 jours), lavées 3 fois, puis des quantités décroissantes de culture centrifugée mesurées à la pipette graduée au centième de centimètre cube. On complète dans chaque tube avec du sérum physiologique à 9 pour 1.000 au volume du premier tube; on mélange intimement par agitation. La lecture des résultats est faite après 2 heures de séjour à l'étuve à 37°. Exemple : souche Mâcon, culture de 10 h. centrifugée.

TABEAU N° 1

Numéro des Tubes	Emulsion de globules à 10 %	Centrifugat	Eau physio- logique	Hémolyse après 2 heures à 37°
	(cc.)	(cc.)	(cc.)	
1	1	0,3	0	++++ c.à.d. Hémolyse totale
2	1	0,2	0,1	++++ — — —
3	1	0,1	0,2	++++ — — —
4	1	0,05	0,25	++++ — — —
5	1	0,03	0,27	+++ — Hémolyse pres- que complète.
6	1	0,02	0,28	++ — Hémolyse incom- plète.
7	1	0,01	0,29	+ — Traces d'hémo- lyse.

L'activité de l'hémolysine se mesure à la quantité minima de centrifugat qu'il faut ajouter à 1 cc. d'hématies de cheval lavées et diluées à 10 % pour obtenir l'hémolyse totale en 2 heures à 37° : dose minima hémolytique (d.m.h.).

Le chiffre représentant cette dose minima hémolytique

a l'inconvénient d'être d'autant plus grand que l'hémolyse est plus faible, aussi prendrons-nous comme terme de comparaison du pouvoir hémolytique le nombre de doses minima hémolytiques contenues dans 1 cc. de centrifugat :

1

———. Dans le cas particulier de l'exemple choisi (tableau I), la culture de 10 heures de la souche Mâcon avait

pour dose minima hémolytique 0 cc. 05 et pour pouvoir hémolytique : $1/0,05 = 20$ doses au cc. De cette façon nous rentrons dans les règles générales d'appréciation de l'activité de toutes les toxines.

Chacun des détails de la technique peut ainsi se justifier :

La nécessité de rajeunir la souche par un premier passage en bouillon-sérum s'impose si on veut obtenir pour un même germe le maximum de pouvoir hémolytique au même âge de la culture. Nous avons constaté, en effet, que pour les cultures conservées à la glacière et repiquées directement dans le milieu définitif d'épreuve, le pouvoir hémolytique maximum était atteint d'autant plus tardivement que le séjour à la glacière avait été plus long; ainsi, telle souche rajeunie donnant dans le milieu d'épreuve son maximum d'activité hémolytique à la 8^e heure ne le donnait qu'à la 24^e heure si on repiquait directement le contenu de l'ampoule scellée ayant séjourné deux mois à la glacière. On peut trouver dans ce fait l'explication des divergences d'opinion des chercheurs quant à l'âge auquel une culture de streptocoque atteint son maximum de pouvoir hémolytique.

Nous reviendrons plus loin sur la composition du milieu qui nous a paru le plus favorable; disons dès maintenant que si le milieu de passage est moins riche en sérum que le milieu d'épreuve, c'est que nous ne voulions pas développer dans le premier une hémolysine trop active, hémolysine qui se trouve nécessairement reportée avec les 5 gouttes d'ensemencement dans le milieu définitif et risque de fausser les résultats.

Le nombre de gouttes repiquées, ainsi que le contenu du tube d'épreuve sont arbitraires, mais ils doivent toujours être les mêmes si on veut établir des comparaisons.

Nous avons été amené à l'emploi de la culture centrifugée après les constatations suivantes maintes fois répétées : dans les conditions de nos expériences, si on sépare par centrifugation rapide et prolongée le milieu de culture et les corps microbiens, on constate que : 1° les corps microbiens remis en émulsion dans un volume d'eau physiologique égal à celui de la culture totale, ne possèdent aucun pouvoir hémolytique; 2° le centrifugat parfaitement clair possède le même pouvoir hémolytique que la culture totale; 3° la filtration sur bougie Chamberland L.3 atténue de façon notable le pouvoir hémolytique de la culture et dans une proportion incertaine, ce qui nous a fait renoncer à la filtration.

Le centrifugat a sur la culture totale les avantages suivants : 1° il permet de séparer nettement, en fait d'activité hémolytique, ce qui revient à l'hémolysine diffusée dans le milieu et ce qui pourrait résulter de l'action directe des germes; 2° il empêche que, pendant le séjour de 2 heures à l'étuve, la culture continue à s'enrichir en hémolysine et change le résultat.

La dose de globules rouges employée a évidemment une grande importance; nous avons adopté celle de la majorité des chercheurs.

Pour égaliser le volume dans tous les tubes, il vaudrait mieux théoriquement compléter avec du milieu de culture stérile plutôt qu'avec de l'eau physiologique; mais nous avons constaté que l'addition du milieu de culture neuf à un centrifugat qui contient fatalement encore quelques germes faisait repartir la culture dès qu'on la plaçait dans des conditions de température favorables. Nous avons pu éviter cet écueil par l'emploi de l'eau physiologique après nous être assuré à maintes reprises que le bouillon Martin enrichi de sérum de cheval n'exerçait par lui-même aucun pouvoir hémolytique sur les hématies employées.

Le séjour de deux heures à l'étuve à 37° nous a paru nécessaire pour que se manifeste au mieux l'action hémolytique; au bout d'une heure, l'hémolyse est seulement amorcée dans les tubes et l'interprétation difficile. On pourrait, comme LAVALLE, accélérer la réaction en plaçant les tubes au bain-marie à 35° au lieu de l'étuve à 37°, ce qui aurait pour effet de hâter le réchauffement des tubes

et par conséquent l'entrée en action de l'hémolysine qui opère au mieux aux environs de 37°; mais nous avons constaté que malgré cette modification le temps de 1 heure est encore trop court et que si on veut absolument s'y tenir, il faut chauffer préalablement à 37° les éléments les plus volumineux de la réaction : émulsion de globules, eau physiologique. Nous avons trouvé plus simple d'opérer à l'étuve à 37° et de laisser 2 heures.

Au début, nous trouvions que la lecture des résultats était plus facile après une nuit de séjour à la glacière succédant aux 2 heures d'étuve; à la sortie de la glacière, en effet, les hématies qui ont échappé à l'hémolyse sont rassemblées en culot dont il est très facile d'évaluer l'importance relative. Mais avec un peu d'habitude, on arrive très bien à apprécier, dès la sortie de l'étuve, les divers degrés de l'hémolyse.

3° Choix d'un milieu de culture

A. — Composition du milieu

En matière de culture de streptocoques, il est classique de reconnaître la supériorité des milieux additionnés d'humeurs animales. Pour la recherche de l'hémolysine, c'est, nous l'avons vu, le bouillon-sérum qui a les préférences de tous les chercheurs; seuls varient : les proportions respectives de bouillon et de sérum, l'espèce animale donneuse de sérum, le chauffage ou le non chauffage à 56° de ce liquide organique.

a) Bouillons simples

Allant du simple au composé, nous avons d'abord comparé le bouillon Martin simple et le bouillon de bœuf ordinaire, tous deux légèrement alcalins (pH 7,4 à pH 7,6) et constaté que le second est meilleur que le premier; voici, par exemple, les résultats obtenus avec la souche Saint-Cyr, culture de 8 heures centrifugée :

TABLEAU N° 2

Numéro des tubes	Centrifugat	RÉSULTATS	
		Bouillon Martin	Bouillon ordinaire
1	0,5	++	++++
2	0,4	++	++++
3	0,3	+	+++
4	0,2	0	++
5	0,1	0	+
6	0,05	0	0

b) Action du glucose

On sait que la principale différence entre bouillon Martin et bouillon ordinaire consiste dans l'absence de sucres fermentescibles dans le premier, aussi avons-nous été amené à rechercher l'influence des sucres. Dans ce but, nous avons ajouté à des tubes de bouillon Martin franchement alcalin (pH 8,2), juste avant l'ensemencement, des quantités progressives de solution stérilisée de glucose à 20 %. L'alcalinité élevée du bouillon avait pour but de compenser dans une certaine mesure l'acidité qui ne pouvait manquer de se développer dans la culture, par la formation d'acides organiques, aux dépens du sucre. Voici les résultats obtenus au titrage de l'hémolyse dans le centrifugat de culture de 8 heures souche Saint-Cyr :

TABLEAU N° 3

Numéro des tubes	Centrifugat	Bouillon Martin glucosé à 1 %	Bouillon Martin glucosé à 2 %	Bouillon Martin glucosé à 4 %	Bouillon Martin glucosé à 8 %	Bouillon Martin glucosé à 16 %
	(cc.)					
1	0,5	++++	++++	++++	++++	++++
2	0,4	++++	++++	++++	++++	++++
3	0,3	++++	+++	++	++	++
4	0,2	+++	++	++	++	+
5	0,1	++	+	+	+	+
6	0,05	++	+	+	+	0

COURBE REPRÉSENTATIVE. — Si on porte en abscisses les proportions pour 1000 de glucose entrant dans les différents milieux et en ordonnées, les pouvoirs hémolytiques

A noter que la production d'hémolysine n'est pas proportionnelle à la richesse du développement microbien, lequel, jugé, soit par le trouble du bouillon, soit par l'importance du culot sédimenté après vingt-quatre heures de glacière, allait en augmentant de façon très importante avec la proportion de glucose, dans les limites de notre essai, c'est-à-dire de 1 à 16 p. 1000 de glucose.

c) Action des humeurs animales

Nous avons ensuite abordé l'étude de l'influence de l'addition au milieu de culture de protéines animales en examinant comparativement les milieux suivants : bouillon-ascite, bouillon-sang laqué, bouillon-sérum.

Le bouillon était du bouillon Martin faiblement alcalin; nous le préférons pour tous les essais qui vont suivre au bouillon ordinaire, lequel, par suite des variations de la teneur en sucres des viandes servant à le préparer, donne, d'une fabrication à l'autre, des résultats différents quant à la production d'hémolysine.

L'ascite était de provenance humaine et de première ponction.

Le sang laqué était obtenu en dissolvant 5 cc. du culot de sédimentation naturelle d'hématies de cheval (sang défibriné) dans 100 cc. d'eau distillée stérile.

Le sérum était du sérum normal de cheval fraîchement prélevé et stérile.

Nous avons préparé les milieux suivants :

Milieu	A. —	Bouillon-Martin	pH 7,6	+	Ascite ââ, soit 50 pour cent d'ascite.
—	B. —	—	pH 7,6	+	Ascite au 1/5 ^e , soit 20 pour cent d'ascite.
—	C. —	—	pH 7,6	+	Ascite au 1/10, soit 10 pour cent d'ascite.
—	D. —	—	pH 7,6	+	Sang laque ââ, soit 50 pour cent de sang laqué.
—	E. —	—	pH 7,6	+	Sang laqué au 1/10, soit 10 pour cent de sang laqué.
—	F. —	—	pH 7,6	+	Sérum non chauffé ââ, soit 50 pour cent de sérum non chauffé
—	G. —	—	pH 7,6	+	Sérum vieux de 6 mois ââ, soit 50 pour cent de sérum vieux.
—	H. —	—	pH 7,6	+	Sérum chauffé (½ h. à 56°) ââ, soit 50 pour cent de sérum chauffé.
—	témoin —	—	pH 7,6		Sans addition aucune.

Voici les résultats obtenus dans ces différents milieux avec des cultures de huit heures centrifugées de la même souche Saint-Cyr :

TABLEAU N° 5

N° des tub.	Centri- fugat	Milieu A	Milieu B	Milieu C	Milieu D	Milieu E	Milieu F	Milieu G	Milieu H	Milieu témoin
	(cc.)									
1	0,3	+	++	++	++	+	++++	++++	++++	+
2	0,2	0	++	+	++	+	++++	++++	++++	0
3	0,1	0	+	0	0	0	++++	++	++	0
4	0,05	0	0	0	0	0	++++	++	++	0
5	0,02	0	0	0	0	0	+++	+	+	0
6	0,01	0	0	0	0	0	++	+	+	0

De l'examen de ces résultats, on peut conclure : 1° l'ascite et le sang laqué ne favorisent pas la production d'hémolysine; 2° le sérum a une action favorisante très marquée et supérieure même à celle du glucose ajouté en proportion la plus convenable (1 p. 1000); 3° le sérum chauffé s'est montré moins bon que le sérum non chauffé; le sérum vieilli moins bon à son tour que les deux précédents.

Ici encore on a pu noter que la production d'hémolysine ne marche pas de pair avec le développement bactérien, lequel, apprécié à l'importance du culot dans la culture de huit heures ayant séjourné ensuite vingt-quatre heures à la glacière se traduit ainsi : très pauvre en bouillon-sang laqué et en bouillon Martin simple, assez riche en bouillon-ascite (dans les limites des proportions essayées, d'autant plus qu'il y a plus d'ascite) particulièrement abondant et à égalité dans les trois tubes de bouillon-sérum.

En vérifiant à l'examen microscopique la pureté de nos cultures, vérification que nous nous sommes imposé dans tous nos essais, nous avons pu remarquer que la morphologie du streptocoque gourmeux varie selon les milieux de culture, observation faite déjà par BROCC-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN. Nous avons vu constamment : en bouillon-sérum de très longues chaînes, très régulières, formées de grains moyennement gros, allongées dans le sens transversal et accolés par deux ;

en bouillon-ascite, des chaînes plus courtes à grains irréguliers comme taille et comme forme, plus gros en général que les précédents et allongés dans le sens de la chaîne; nombreuses formes à deux articles ;

en bouillon-sang laqué, les chaînes sont assez longues et parfaitement régulières, les grains très petits ;

en bouillon Martin simple, les chaînes sont courtes et retiennent mal le grain.

d) *Influence des proportions respectives de bouillon et de sérum*

Ayant vérifié sur différentes souches que le bouillon-sérum non chauffé constituait, pour la production de l'hémolysine, le milieu de choix, nous avons recherché quelles étaient les proportions relatives de bouillon et de sérum les plus convenables.

Pour cela, nous avons préparé une première série de tubes comme suit :

Tubes	Sérum non chauffé (cc.)		Bouillon Martin pH 7,6 (cc.)	soit 100 pour cent de sérum			
A	5	+	0	—	80	—	—
B	4	+	1	—	50	—	—
C	2,5	+	2,5	—	20	—	—
D	1	+	4	—	10	—	—
E	0,5	+	4,5	—	2	—	—
F	0,1	+	4,9	—	0	—	—
G	0	+	5	—	0	—	—

Nous avons mesuré, dans ces milieux différents, le pouvoir hémolytique d'une culture de huit heures centrifugées (souche Saint-Cyr) ; voici les résultats :

TABLEAU N° 6

N° des tub.	Centri- fugat	Tube A	Tube B	Tube C	Tube D	Tube E	Tube F	Tube G
	(cc.)							
1	0,3	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
2	0,2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	0
3	0,1	++	++++	++++	++++	++++	++	0
4	0,05	++	++++	++++	++++	++	+	0
5	0,02	0	++++	++++	++++	++	0	0
6	0,01	0	++	++	++	+	0	0

Nous en déduisons : 1° que c'est autour de 50 % que la proportion de sérum est le plus convenable; 2° que le pouvoir hémolytique diminue de chaque côté de cet optimum, mais moins vite du côté sérum puisque dans le sérum pur on obtient encore l'hémolyse totale avec 0 cc. 2, tandis que dans le bouillon Martin pur on n'a que des traces d'hémolyse avec 0 cc. 3.

Serrant de plus près les proportions des deux liquides, nous avons préparé une seconde série de tubes de la façon suivante :

Tubes	Sérum non chauffé (cc.)		Bouillon Martin pH 7,6 (cc.)			
A	3,5	+	1,5	soit 70 pour cent de sérum		
B	3	+	2	— 60	—	—
C	2,5	+	2,5	— 50	—	—
D	2	+	3	— 40	—	—
E	1,5	+	3,5	— 30	—	—

La même culture de huit heures a donné en hémolyse les résultats suivants :

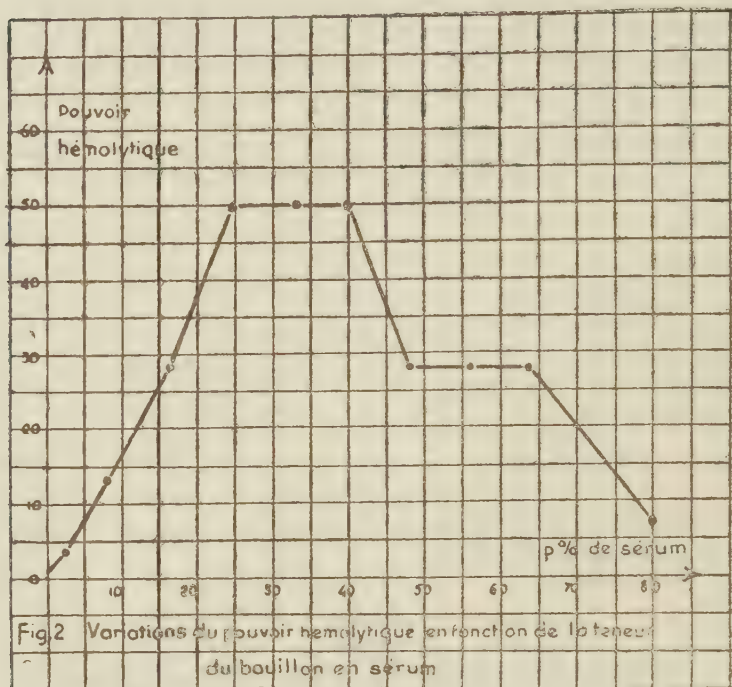
TABLEAU N° 7

Numéro des tubes	Centrifugat	Tube A	Tube B	Tube C	Tube D	Tube E
	(cc.)					
3	0,1	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
4	0,05	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
5	0,02	+++	+++	+++++	+++++	+++++
6	0,01	++	++	+++	+++	++++

C'est-à-dire que, entre 50 % de sérum et 30 % de sérum, on n'observe pas de différence dans le développement des hémolysines; nous avons retenu pour les recherches ultérieures la proportion de 40 %.

COURBE REPRÉSENTATIVE. — Nous avons porté en abscisses les chiffres représentant la proportion pour 100 de sérum entrant dans la composition des différents milieux,

et en ordonnées les chiffres mesurant le pouvoir hémolytique correspondant (fig 2).



e) Action simultanée du sérum et du glucose

Connaissant maintenant l'action favorisante d'une part, du glucose, d'autre part, du sérum, il nous restait à rechercher si l'addition des deux substances au même bouillon Martin entraînerait une accumulation des conditions favorables.

Nous avons, dans ce but, réalisé l'essai suivant : du bouillon-sérum (bouillon Martin 60 parties, sérum non chauffé de cheval 40 parties) est glucosé à des taux semblables à ceux du tableau 3. La culture de huit heures a donné, dans de tels milieux, le pouvoir hémolytique suivant :

TABLEAU N° 8

Numéro des tubes	Centrifugat	Bouillon Sérum glucosé à 1 ‰	Bouillon Sérum glucosé à 2 ‰	Bouillon Sérum glucosé à 4 ‰	Bouillon Sérum glucose à 8 ‰	Bouillon Sérum glucose à 16 ‰
	(cc.)					
1	0,3	++++	++++	++++	++++	++++
2	0,2	++++	++++	++++	++++	++++
3	0,1	++++	++++	+++	+++	+++
4	0,05	++++	++++	++	++	++
5	0,02	+++	+++	+	+	0
6	0,01	++	++	+	+	0

C'est-à-dire que le glucose ajouté au bouillon-sérum en faible quantité (moins de 3 p. 1000) ne joue aucun rôle, comme si le bouillon-sérum contenait d'emblée tous les éléments nécessaires à la formation de l'hémolysine; ajouté en quantité plus grande, le glucose exerce une action défavorable que l'on peut attribuer comme dans l'essai du tableau 3 à l'acidité développée à ses dépens, mais cette action défavorable est moins énergique qu'en bouillon Martin simple; la présence du sérum réduit d'ailleurs les écarts d'acidité comme en témoigne la mesure du pH dans les cultures de huit heures (tableau 9 à comparer au tableau 4). Le rôle des substances tampons du sérum est évidemment en cause.

TABLEAU N° 9

Bouillon	Sérum	glucosé à	1 ‰	—	de pH 7,5 à pH 7,4
—	—	à	2 ‰	—	de pH 7,5 à pH 7,1
—	—	à	4 ‰	—	de pH 7,5 à pH 6,5
—	—	à	8 ‰	—	de pH 7,5 à pH 6,1
—	—	à	16 ‰	—	de pH 7,5 à pH 6

B. — Réaction du milieu

Il restait encore à résoudre le problème de la réaction du milieu la plus favorable à la production de l'hémolysine.

BESREDKA emploie du sérum de lapin chauffé sans aucune addition, donc de pH voisin de 7,3-7,4.

LUBENAU utilise un milieu qu'il alcalinise selon les indications de NEISSER et WECHSBERG pour le staphylocoque, c'est-à-dire avec le tiers de la quantité de soude nor-

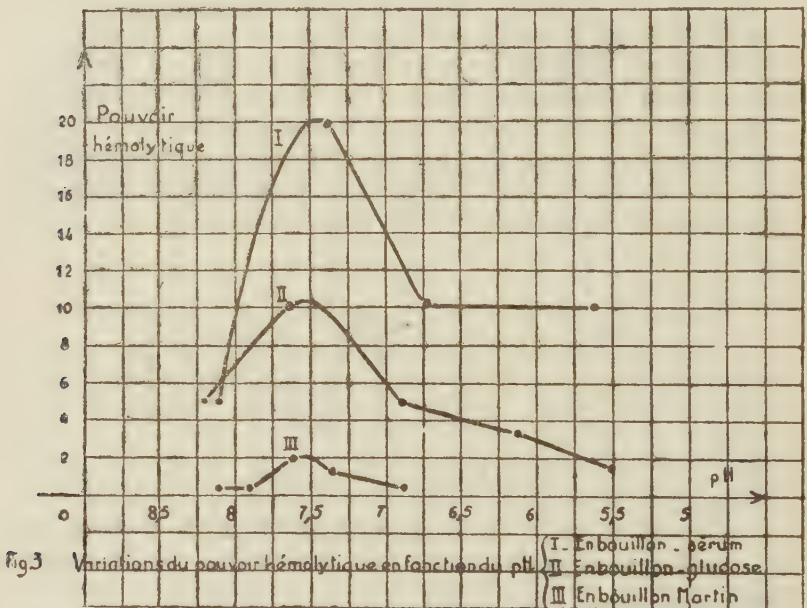
male qui serait nécessaire pour neutraliser complètement à la phénolphtaléine.

MAC LEOD indique une réaction nettement alcaline au tournesol.

UMENO, qui travaille sur milieu solide, fixe l'alcalinité optima entre pH 7,5 et pH 7,8.

Il semble que les auteurs aient attaché peu d'importance à cette question de la réaction précise du milieu de culture; faut-il en conclure avec PRIBRAM que le pH du bouillon joue un rôle peu important dans la question de l'hémolysine streptococcique?

Nous avons entrepris quelques vérifications à ce sujet et mesuré l'influence du pH, c'est-à-dire de l'acidité ionique d'abord en bouillon Martin simple, puis dans deux milieux qui nous ont paru les meilleurs d'après nos précédents essais : bouillon Martin glucosé à 2 p. 1000 et bouillon Martin-sérum à 40 %.



1° En bouillon Martin simple. — Du bouillon Martin simple a été ajusté aux pH suivants entre 8,2 et 6 ; la culture de huit heures, titrée en hémolysine, a donné les résultats suivants :

TABLEAU N° 10

Numéro des tubes	Centrifugat	pH 8,2	pH 7,9	pH 7,6	pH 7,4	pH 7,1	pH 6,9	pH 6,6	pH 6,4	pH 6,1	pH 5,8
	(cc.)										
1	0,4	+	+	++	+	+	+	0	0	0	0
2	0,3	0	0	++	+	+	0	0	0	0	0
3	0,2	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
4	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0,05	0	0		0	0	0	0	0	0	0

Donc en bouillon Martin, on a obtenu une hémolysine faible entre pH 8,2 et pH 6,9 avec un maximum vers pH 7,6-7,4.

2° En bouillon Martin glucosé à 2 p. 1000. — Un tel bouillon a été ajusté aux pH ci-dessous entre 8,3 et 5,5, et a donné en hémolysine les taux suivants :

TABLEAU N° 11

Numéro des tubes	Centrifugat	pH	Départ Cultures 8 heures	8,3	7,6	6,9	6,2	5,5
				8,4	6,6	6,2	6,3	6,4
	(cc.)							
1	0,3			++++	++++	++++	++++	++
2	0,2			++++	++++	++++	+++	+
3	0,1			+++	+++	+++	++	0
4	0,05			++	++	++	+	0
5	0,02			+	++	+	0	0
6	0,01			+	++	+	0	0

Donc, en bouillon Martin glucosé à 2 p. 1000, c'est encore vers pH 7,5 que l'hémolysine est produite en plus grande quantité. Si on compare les pH des cultures de huit heures aux pH de départ on constate que si les milieux alcalins sont devenus acides, ce qui est bien connu, les milieux acides ont corrigé leur acidité par diminution. En présence de ce fait inattendu, nous avons refait plusieurs fois l'expérience avec des résultats du même ordre; nous avons même éliminé toute idée de réactions possi-

bles entre le milieu et le verre du tube en laissant des tubes témoins stériles de chacun des pH différents, témoins qui subissaient les huit heures d'exposition à 37° sans voir changer leur pH.

3° *En bouillon-sérum à 40 %*. — Le tableau 12 rend compte des pH réalisés dans un tel milieu (départ et après huit heures de culture) et des résultats obtenus au titrage de l'hémolysine.

TABLEAU N° 12

Numéro des tubes	Cen- tri- fugat	pH	Départ	8,1	7,5	6,8	6,3	5,6
			Culture 8 heures	7,9	7,5	7,2	6,9	6,2
	(cc.)							
1	0,3			++++	++++	++++	++++	++++
2	0,2			++++	++++	++++	++++	++++
3	0,1			+++	++++	+++	++++	++++
4	0,05			++	+++	++	+++	++
5	0,02			+	++	+	++	+
6	0,01				+		+	

Donc, en bouillon-sérum à 40 %, c'est encore aux environs de pH 7,5 que le milieu donne au maximum l'hémolysine; l'influence néfaste de l'acidité s'y fait moins sentir qu'en bouillon ordinaire ou en bouillon glucosé (rôle des substances tampons).

A l'examen des pH des cultures de huit heures, nous constatons que si les milieux alcalins maintiennent sensiblement leur pH, les milieux acides, cette fois encore, se corrigent sensiblement en se rapprochant plus ou moins de la neutralité. Ici encore, des milieux témoins stériles éliminent toute idée de variation de pH indépendante du développement du streptocoque.

COURBE REPRÉSENTATIVE. — Si on inscrit en abscisses les valeurs du pH et en ordonnées les pouvoirs hémolytiques, on obtient pour chacun des trois milieux examinés la courbe des variations du pouvoir hémolytique en fonction du pH. Nous avons réuni les trois courbes sur la fig. 3.

Ainsi, nous sommes en possession d'un excellent mi-

lieu pour l'étude de l'hémolysine du streptocoque gourmeux : bouillon Martin de pH 7,4-7,6, additionné de 40 % de sérum frais de cheval.

4° De quelques propriétés de l'hémolysine

A. — Rapport entre pouvoir hémolytique et âge de la culture

Les auteurs ont opéré la recherche de l'hémolysine à des âges différents de la culture et il semble que le temps nécessaire à l'établissement du maximum d'activité soit variable et avec le milieu de culture adopté et avec la race du streptocoque.

BESREDKA filtre des cultures de vingt-quatre heures pour en extraire la streptocolysine.

MAC LEOD trouve un maximum d'activité hémolytique vers la dix-huitième heure; VON HELLENS entre sept et dix-huit heures; DE KRUIF et IRELAND entre sept et huit heures à condition d'ensemencer avec une culture de huit à douze heures; avec un ensemencement plus ancien, il faut compter douze heures.

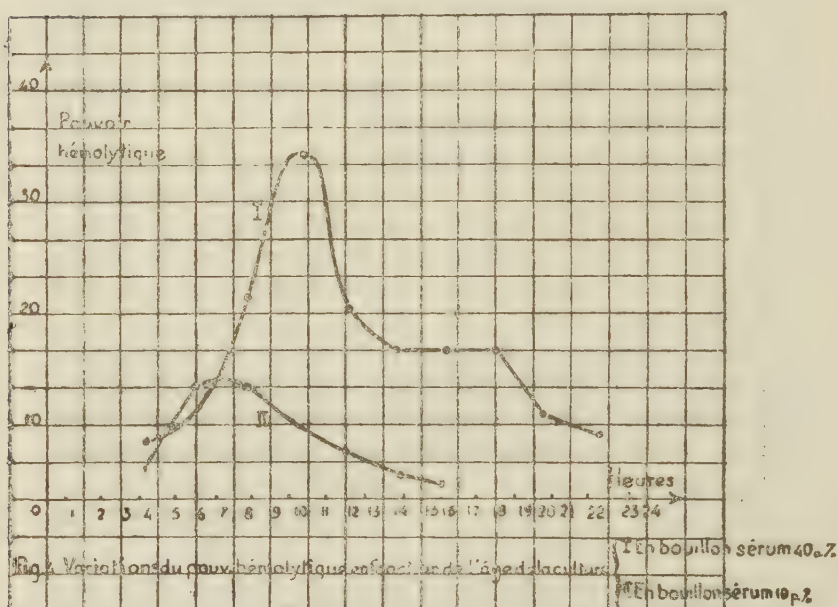
BROCQ-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN recherchent la streptocolysine gourmeuse dans une culture de vingt-quatre heures; BRAUN interroge des cultures de huit à dix heures. Pour LAVALLE, tandis que certains échantillons offrent leur maximum de pouvoir hémolytique vers la huitième heure, d'autres ne la manifestent que vers la quinzième.

En titrant le pouvoir hémolytique d'une culture toutes les deux heures, nous avons pu établir, pour un certain nombre de souches, la courbe de variation du pouvoir hémolytique dans le temps.

Rappelons que pour établir des essais comparatifs, il est indispensable d'opérer toujours dans des conditions aussi rigoureusement similaires que possible de composition du milieu d'épreuve, d'âge de la culture rajeunie qui sert à l'ensemencement, de gouttes repiquées, de température du milieu d'épreuve au moment de l'ensemence-

ment, un grand nombre d'essais préalables nous ayant montré l'importance parfois considérable de chacun de ces facteurs.

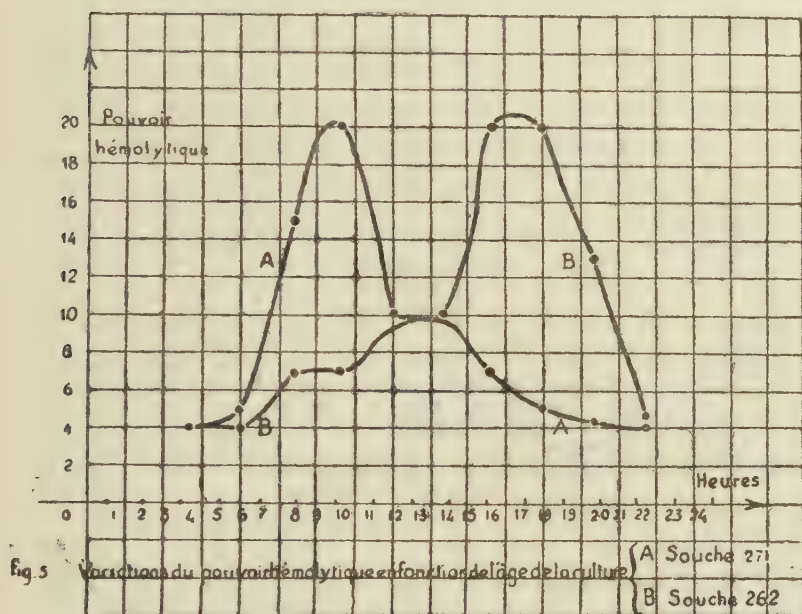
En particulier, l'importance de la composition du milieu d'épreuve ressort de la comparaison des deux courbes suivantes (fig. 4), se rapportant à la même souche mais à deux milieux différents, l'un pauvre en sérum (10 %), l'autre riche en sérum (40 %). Dans le premier, le maximum est atteint vers la septième heure, la décroissance est rapide jusqu'à être complète vers la quinzième heure; dans le second, le maximum n'apparaît que vers la dixième heure et le pouvoir hémolytique se maintient en s'affaiblissant jusque vers la vingt-quatrième heure.



Le même essai répété avec des souches différentes nous a constamment montré que dans le milieu de choix, le pouvoir hémolytique maximum apparaît toujours un peu plus tardivement et que la baisse du pouvoir hémolytique s'opère beaucoup plus lentement.

Nous avons établi la courbe hémolytique en milieu de choix de 15 souches de streptocoque gourmeux. Dans l'en-

semble, nous distinguons deux types reproduits ci-contre (fig. 5) type A (exemple choisi, souche 271), type B (souche 262); au premier, se rattachent 14 de nos souches, avec, bien entendu, des valeurs absolues très différentes; au second, une seulement (essai vérifié à plusieurs reprises et à différentes dates).



Dans les deux types, le pouvoir hémolytique apparaît vers la quatrième heure pour disparaître vers la vingt-quatrième heure, mais tandis que pour le type A, ce pouvoir croît rapidement pour atteindre son maximum vers la dixième heure et décroître lentement, dans le type B, au contraire, il croît lentement, pour être maximum entre seize et dix-huit heures et décroître enfin rapidement.

B. — Pouvoir hémolytique de différentes souches

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant où nous avons indiqué la provenance des souches ainsi que leur pouvoir pathogène :

TABLEAU N° 13

Désignation des souches	Provenance anatomique	Pouvoir pathogène	Pouvoir hémolytique maximum
Saint-Cyr	Moëlle osseuse d'un cheval mort de pneumonie gour- meuse.	Tue le cobaye à la dose de 2 cc. inoculée sous la peau.	25 d. m. h. au cc.
Caen	Absès sous- glossiens.	Tuent la souris à la dose de 1/10 cc. sous la peau.	33 — —
1627			25 — —
Mâcon	Liquide pleuré- tique d'un cheval atteint de pleurésie gourmeuse.	Tue le cobaye à la dose de 3 cc. inoculés sous la peau.	25 — —
Artoize			20 — —
321			20 — —
1893			20 — —
6857			25 — —
7055			20 — —
262			20 — —
			20 — —
271	Absès sous- glossiens.	Tuent la souris à la dose de 1/10 cc. sous la peau.	20 — —
312			14 — —
521			14 — —
Eloxa			25 — —
	Liquide péricar- dique d'un cheval mort de septicémie gourmeuse.	Tue la souris au 1/10 cc. sous la peau.	
Saint-Cyr lapin	Souche Saint-Cyr ayant subi des pas- sage sur lapin.	Pouvoir patho- gène inchangé.	50 — —

De l'examen de ce tableau, il résulte que : 1° l'activité hémolytique est très différente selon les souches; elle varie dans nos essais du simple au quadruple; 2° qu'il n'y a aucun rapport à établir entre virulence et pouvoir hémolytique : les souches les plus pathogènes, celles qui tuent le cobaye par voie sous-cutanée n'étant pas les plus hémolytiques; 3° que le passage sur l'animal d'expériences exalte le pouvoir hémolytique.

C. — Filtrabilité

La filtrabilité de l'hémolysine streptococcique n'est pas unanimement reconnue par les auteurs.

BESREDKA (1901) obtient la streptocolysine par filtration sur bougie Chamberland de la culture de vingt-quatre heures en sérum de lapin, diluée de son volume d'eau physiologique.

RUEDIGER (1903) constate la filtrabilité de la streptocolysine dans les mêmes conditions.

KERNER (1905) trouve que seules les cultures faites sur sérum sanguin donnent après filtration sur bougie des liquides hémolytiques.

MAC LEOD (1912) reconnaît que tous les filtres ne conviennent pas à la séparation de la streptocolysine; les meilleurs sont les filtres Maassen et Doulton.

JUPILLE (1911) filtre dans les mêmes conditions que BESREDKA et obtient les mêmes résultats.

DE KRUIF et IRELAND (1920) séparent l'hémolysine par centrifugation, ce procédé leur ayant toujours paru supérieur à celui du titrage des filtrats ou des cultures complètes.

MEADER et ROBINSON (1920) constatent que l'hémotoxine du streptocoque est plus ou moins retenue par les filtres par un phénomène de fixation et d'adsorption; le pouvoir du bouillon de culture hémotoxique est diminué si on l'agite avec de la poudre fournie par le broyage d'un filtre.

BROCQ-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN (1924) filtrent sur bougie Chamberland dans les mêmes conditions que BESREDKA.

LAVALLE (1927) a obtenu des résultats variables suivant les filtrations; la bougie BERKFELD lui a donné tantôt des filtrats aussi actifs que la culture, tantôt très affaiblis.

En somme, il semble que la filtration devienne aléatoire dès qu'on s'écarte du milieu de BESREDKA : le sérum de lapin pur.

Les résultats que nous avons obtenus confirment cette manière de voir. Chaque fois que nous avons voulu séparer l'hémolysine de la culture par filtration sur bougie L3, nous avons constaté, comparativement avec la culture totale, un affaiblissement alors que la centrifugation à grande vitesse nous donnait un liquide ayant conservé toute son activité. En voici un exemple donné par une culture de douze heures en bouillon-sérum à 40 % de la souche 262 :

TABEAU N° 14

Numéro des tubes	Dose d'essai	Culture totale	Centrifugat	Filtrat
	(cc.)			
1	0,3	++++	++++	++++
2	0,2	++++	++++	+++
3	0,1	+++	+++	++
4	0,05	++	++	+
5	0,02	+	+	0
6	0,01			0

Cet affaiblissement de l'hémolysine dû à la filtration ne nous aurait pas fait renoncer aux avantages de ce mode d'élimination des germes s'il s'était toujours manifesté dans les mêmes proportions. Au contraire, quelles que soient les précautions prises pour opérer dans les mêmes conditions, il suffisait de changer de bougie pour obtenir des résultats différents.

Si la filtration est simplement défectueuse quand elle s'adresse à du bouillon additionné de 40 % de sérum, nous l'avons trouvée franchement mauvaise avec du bouillon qui ne contient que 10 % de sérum. Avec ce dernier milieu, la filtration sur bougie Chamberland L3 retient en général la presque totalité de l'hémolysine.

D. — Conservation de l'hémolysine. Action de la chaleur

BESREDKA a constaté que la streptocolysine préparée dans les conditions qu'il a lui-même fixées, résiste bien à 55°-56°, demi-heure; à 70°, il faut deux heures pour la détruire. Elle est sensible à l'action prolongée d'une chaleur modérée : 10 heures à 55° la détruisent; à 37°, elle baisse en quelques jours; à la température du laboratoire, elle est très affaiblie après quinze jours; après vingt jours, elle n'existe plus qu'à l'état de traces.

SCHLESINGER, qui opère sur des cultures totales et non plus sur la streptocolysine filtrée, voit l'hémolysine détruite en quinze minutes par le chauffage à 60°.

RUEDIGER trouve, comme BESREDKA, la streptocolysine thermostable; elle n'est pas modifiée par chauffage demi-heure à 60°; pour l'atténuer, il faut demi-heure à 65°.

Pour KERNER, l'hémolysine filtrée se détruit à 55° en trente minutes.

BRAUN constate à son tour la fragilité de l'hémolysine streptococcique qu'il trouve détruite par demi-heure de chauffage à 60° et par six heures de séjour à 37°.

LAVALLE détruit l'hémolysine streptococcique en dix minutes à 70°, trente minutes à 56°, une heure à 45°, deux heures à 37°; par contre, il la voit résister quatre-vingt-douze heures à 40°.

Ainsi, les résultats obtenus par les différents auteurs sont encore ici différents. Il en est de cette action des filtres et de la chaleur sur l'hémolysine, comme de l'action de tous les agents physiques, chimiques, biologiques sur toutes les toxines en général : le milieu colloïdal complexe qu'est le bouillon de culture n'est pas sans intervenir dans un sens favorable ou défavorable à cette action. Les recherches faites sur la toxine diphtérique, et notamment celles de LEULIER, SEDAILLAN et CLAVEL (1929) en sont un exemple démonstratif.

Avec le centrifugat d'une culture de streptocoque gourmeux, nous avons constaté que le chauffage de demi-heure à 56° n'a aucun effet affaiblissant sur l'hémolysine. Il faut, pour la détruite, deux heures à 60°, quatre heures à 50°. Elle s'atténue lentement à 37° puisqu'elle est intacte après six heures, mais diminuée de plus de moitié après vingt-quatre heures. A la température du laboratoire, elle baisse en vingt-quatre heures de 1/3 environ. C'est, comme on devait s'y attendre, à la glacière qu'elle se conserve le mieux; on la retrouve intacte après quarante-huit heures et après sept jours, la dose minima hémolytique est modifiée seulement dans le rapport de 1 à 3.

E. — Réactivation de l'hémolysine atténuée

Un certain nombre d'hémotoxines bactériennes atténuées par vieillissement se laissent réactiver par addition de divers produits. Exemples :

Chlorure de calcium pour les hémolysines du *v. cholérique*, du *B. de Friedlander*, du *B. mesentericus*, du *Proteus vulgaris* (H. VINCENT, C. DOPTER et BILLET) pour l'hémolysine du *M. megatherium* (H. VINCENT).

Peptone pour staphylolysine, téta-nolysine, mégathériolysine, vibriolysine (WALBUM).

Hyposulfite de soude pour hémotoxines du pneumocoque, du *B. perfringens*, téta-nolysine et steptolysine (J.-M. NEILL).

En ce qui concerne l'hémolysine du streptocoque, BESREDKA constate que ni le sérum neuf, ni la streptocolysine fraîche ne sont capables de réactiver une streptocolysine ayant perdu son pouvoir hémolytique par vieillissement.

LAVALLE fait les mêmes constatations avec une hémolysine chauffée trente minutes à 58°.

Nous avons essayé l'action du chlorure de calcium sur trois hémolysines atténuées : l'une par vieillissement de trois semaines à la glacière, une autre de vingt-quatre heures à 37°, la troisième de une heure à 50°. Le chlorure de calcium était ajouté dans la proportion de 1 p. 2000, dose employée par H. VINCENT pour l'hémolysine du *B. Megatherium*. Dans aucun cas nous n'avons obtenu de réactivation.

F. — Influence de la nature des hématies

BESREDKA constate que la streptocolysine n'a aucune spécificité vis-à-vis de l'espèce de globules rouges; elle dissout facilement les globules de lapin, homme, cobaye, mouton; un peu moins ceux de cheval et de bœuf (à noter qu'il travaillait avec le streptocoque de MARMOREK, à virulence exaltée par passages sur lapin).

KERNER confirme que l'hémolysine streptococcique n'agit pas spécifiquement sur les hématies d'une espèce déterminée.

Pour MAC LEOD et MAC NEE, elle agit aussi bien sur le sang humain que sur celui des autres mammifères.

BRAUN observe une action plus marquée sur les globules de lapin, de souris, d'homme.

LAVALLE n'a constaté aucune différence importante dans le pouvoir hémolytique examiné vis-à-vis des hématies d'homme, de cheval, de bœuf, de porc, de lapin, de cobaye.

Tous ces auteurs s'adressent à des streptocoques les plus divers, mais de provenance humaine pour la plupart.

BROCQ-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN qui étudient le

streptocoque de la gourme du cheval lui trouvent un pouvoir hémolytique marqué pour les hématies de cheval, de mouton, de cobaye, avec une action plus intense sur les globules de cheval.

Dans les conditions de nos expériences, nous n'avons pu constater que des différences insignifiantes dans l'action de l'hémolysine du streptocoque gourmeux vis-à-vis des hématies de cheval, de mouton, de bœuf, de lapin, de cobaye, d'homme. Il est difficile d'affirmer d'ailleurs que les suspensions de globules des différentes espèces aient rigoureusement la même richesse en hématies; cependant, pour éviter une erreur trop grossière, on avait soin de prélever un volume fixe de globules à laver dans le culot globulaire spontanément sédimenté d'un tube de sang défibriné, mais cette mesure volumétriquement assez exacte n'entraîne aucune similitude rigoureuse ni dans le poids, ni dans le nombre des diverses hématies soumises à l'action de l'hémolysine dans 1 cc. d'émulsion à 10 %.

Donc, l'hémolysine du streptocoque gourmeux dissout les hématies de différents mammifères. Au contraire, les hématies nucléées de poule se sont montrées absolument insensibles à son action à toutes les doses.

Dans nos recherches, nous nous sommes servi indifféremment de globules lavés de cheval ou de mouton et très souvent des deux simultanément et par comparaison sans leur trouver de différence de sensibilité à l'hémolysine.

G. — Origine, nature et mode d'action de l'hémolysine

Bien que nous n'apportions aucun résultat de recherches personnelles à ce sujet, nous réunirons dans ce paragraphe divers faits glanés au cours de la documentation bibliographique et capables d'apporter quelque lumière sur les questions qui se posent tout naturellement à l'esprit au cours d'une étude sur l'hémolysine.

Quel est dans la culture, dans le centrifugat, dans le filtrat, le principe actif capable de dissoudre les hématies? de quelle nature est-il? comment agit-il sur le globule?

Et d'abord, faut-il chercher la solution en raisonnant par analogie avec ce qui se passe pour des hémolysines chimiquement connues ou même pour d'autres hémotoxines bactériennes? Assurément non, car l'étude expérimen-

tale a montré depuis longtemps que chaque hémolysine avait ses caractères propres; d'ailleurs n'avons-nous pas été obligé de faire des réserves au début de ce travail quant à la classification de l'hémolysine streptococcique dans les hémotoxines bactériennes? Aussi, seuls, nous retiendront les travaux intéressant l'hémolysine streptococcique.

SCHLESINGER (1903) rapporte que si on fait agir sur une goutte de sang de lapin 5 cc. d'un bouillon streptococcique de huit jours, il ne se produit pas d'hémolyse; alors, les globules rouges sont lavés et mis en présence de 5 cc. d'une culture fortement hémolytique, l'hémolyse est nulle. L'auteur suppose que l'appauvrissement de l'hémolysine d'une culture de huit jours non réensemencée tiendrait à la transformation en hémolysoïde.

RUEDIGER (1903) constate que la streptocolysine est détruite par la pepsine et qu'elle est empêchée dans son action par le formol en solution faible.

VON HELLENS (1913) traite des cultures de streptocoques par l'éther et constate que l'hémolysine est entraînée par ce solvant d'où on peut l'extraire par évaporation; ainsi extraite, elle devient insensible à la température de l'ébullition.

GORDON (1927) montre que le déplacement des parties solubles du bouillon dans l'éther ne diminue pas la valeur du milieu pour la streptolysine. Pour lui, la production de cette toxine n'est pas sous la dépendance de la lipase contenue dans les corps microbiens; son action lytique est empêchée par la bile et par les sels biliaires, ce qui la différencie de celle de la saponine et de l'acide oléique que la bile n'influence pas.

WOLLMAN et GRAVES (1924) constatent que l'hémolysine streptococcique ne s'accompagne pas de protéolyse, c'est-à-dire que la lyse des globules rouges n'est pas liée à une attaque des protéines globulaires.

MEADER et ROBINSON (1920) démontrent qu'il ne se produit pas d'hémotoxine dans un bouillon privé de phosphore, que l'addition de cholestérine n'empêche pas sa formation, tandis que l'addition de lécithine l'empêche. Dans un bouillon, les facteurs qui favorisent le développement bactérien sont distincts de ceux qui favorisent la production d'hémotoxine. Leurs conclusions sont les suivantes : l'hémotoxine a pour origine : a) un composé phos-

phoré; b) une substance inconnue présente dans les tissus (muscle, rein), dans les humeurs, soluble dans l'eau, fragile; c) ce n'est pas une enzyme.

GORDON et STANSFIELD (1929) n'ont pas réussi à extraire l'hémolysine par l'éther comme l'avait fait VON HELLENS, non plus d'ailleurs que LAVALLE (1927). GORDON et STANSFIELD montrent encore que la lécithine ajoutée à des cultures de streptocoque hémolytique neutralise l'action hémolytique; que la ligroïne, excellent solvant de la lécithine, n'entraîne ni ne détruit l'hémolysine; que l'activité hémolytique d'une culture de streptocoques ne peut pas être restituée par traitement avec un solvant de la lécithine après qu'elle a été une fois détruite par l'addition de lécithine.

Si on réduit tous ces résultats à ceux exposés dans les précédents paragraphes, on peut conclure :

1° Quant à l'origine de l'hémolysine streptococcique : elle dérive d'un composé phosphoré, soluble dans l'eau, présent dans le bouillon de viande et dans le sérum et qui n'est pas la lécithine.

2° Quant à sa nature : elle est fragile (sensible au vieillissement, à la chaleur, aux antiseptiques légers, à la pepsine), insoluble dans l'éther et la ligroïne.

3° Quant à son mode d'action : son effet lytique est empêché par la bile, les sels biliaires, la lécithine, il ne l'est pas par la cholestérine; il ne s'exerce pas sur les protéines du globule rouge.

H. — Action de l'hémolysine sur l'animal vivant

Le streptocoque est-il capable de produire de l'hémolysine active quand il cultive dans l'organisme vivant? Quel effet produit dans l'organisme l'inoculation d'hémolysine développée *in vitro*? Tels sont les deux aspects principaux de la question.

Après BORDET (1897), BESREDKA (1901) attire l'attention sur l'aspect laqué du sang du cœur d'un lapin mort de streptococcie expérimentale et sur le fait que seul, le streptocoque est capable de faire de l'hémolyse *in vivo*.

TCHITCHKINE (1906) administre à des lapins, *per os*, de l'hémolysine streptococcique; elle lui paraît tout à fait inoffensive.

BRETON (1903) attribue à l'hémolysine développée *in vivo* le fait qu'un lapin inoculé de streptocoque présente parfois, dès la dixième heure avant la mort, un sang laqué; il constate que le sérum d'un tel lapin est capable d'hémolyser *in vitro* les globules rouges d'un lapin neuf et mieux encore, ses propres globules.

RUEDIGER (1901) constate que la streptocolysine est toxique; sur sept lapins, elle en tue six dont le sang et les organes se montrent stériles.

MAC LEOD et MAC NEE (1913) inoculent de l'hémolysine à des lapins et constatent que les uns succombent et les autres survivent mais présentent une anémie définitive. Ils constatent des changements du sang semblables à ceux des autres anémies expérimentales (saponines, phénylhydrazines): moëlle osseuse avec lésions de suractivité fonctionnelle, hémosidérose réactionnelle dans le foie, la rate, les reins; myélocytes collectés en grand nombre, beaucoup en état mitotique actif dans le voisinage des corps malpighiens.

HALLENBERGER (1918) recherche si une infection chronique à streptocoque peut déterminer des altérations du sang comme celles que l'on voit dans l'anémie pernicieuse et la leucémie. De ses essais expérimentaux sur le lapin, il conclut que ni dans le sang périphérique, ni dans les organes hémopoïétiques des lapins traités par des streptocoques tués ou vivants, on ne trouve le tableau qui rappelle celui de l'anémie pernicieuse ou de la leucémie.

PULVERTAFT (1929) a étudié l'effet des toxines streptococciques sur plus de 250 lapins; il distingue deux toxines différentes: la toxine proprement dite et l'hémolysine qui se forment à des temps différents de la culture et qui produisent des lésions différentes chez le lapin. Tandis que la toxine produit de la leucocytose, une néphrite hémorragique, des lésions hémorragiques de l'estomac, des reins, du poumon, du péritoine, l'hémolysine produit de la leucopénie et des hémorragies locales en injection intramusculaire, ou intrapéritonéale, même chez les animaux immunisés contre la toxine.

LAVALLE (1927) n'a jamais observé du vivant des lapins inoculés l'aspect laqué du sang; il en conclut, après BORDET, que les altérations du sang se produisent seulement pendant l'agonie ou après la mort. Quant à l'effet de l'ino-

culation d'hémolysine préparée *in vitro*, il constate une sensibilité inégale du lapin; il réussit avec des doses massives (45 cc.) introduites par voie veineuse, à provoquer chez un lapin sur quatre de l'hémoglobinurie dans les 4 heures qui ont suivi l'injection.

Ainsi, il semble que dans l'infection streptococcique expérimentale, le rôle pathogène de l'hémolysine s'efface devant celui des autres produits du développement microbien; ce ne serait que dans la période agonique, alors que le streptocoque ayant vaincu toute résistance envahit les humeurs et les tissus, que les hématies pourraient se laisser dissoudre en libérant l'hémoglobine. Pour produire des lésions hémolytiques du vivant de l'animal, il faut se mettre dans des conditions exceptionnelles : animal particulièrement sensible, doses massives d'hémolysine portées directement au contact des globules par inoculation intraveineuse; encore, ces lésions qui se traduisent par de l'hémoglobinurie et une diminution du nombre des hématies sont-elles passagères et n'entraînent-elles pas une anémie définitive.

Que se passe-t-il dans la maladie naturelle engendrée chez le cheval par le streptocoque gourmeux?

Il ne semble pas que l'action de l'hémolysine ait particulièrement retenu l'attention des cliniciens. Dans aucune des formes de la gourme, les classiques ne signalent la destruction globulaire massive se traduisant du vivant de l'animal par de l'hémoglobinurie et une anémie profonde, et sur le cadavre par des lésions hémolytiques, qu'on s'adresse au *Traité de pathologie interne des animaux domestiques* de CADEAC, au *Dictionnaire Vétérinaire* de FONTAINE et HUGUIER, au *Traité de Médecine des animaux domestiques* de CADIOT, LESBOUYRIES et RIES, au *Traité des Maladies microbiennes des animaux* de NOCARD et LECLAINCHE. Ce dernier ouvrage signale cependant que dans la forme chronique de la gourme, « chez quelques animaux, on constate des troubles consécutifs exprimés par un état d'anémie progressive aboutissant à la cachexie et à la mort ».

A la clinique de l'Ecole de Cavalerie de Saumur, en 1921, au cours de recherches sur la sédimentation spontanée du sang chez le cheval, nous avons précisément examiné un grand nombre de chevaux atteints des formes les plus diverses de la gourme au point de vue de la richesse du

sang en hématies. Un des objets de notre travail étant de déterminer la valeur de la méthode de sédimentation de Césari pour l'appréciation de l'anémie, nous opérions, sur chaque échantillon de sang prélevé, la double épreuve comparative de la hauteur du sédiment globulaire en tube étroit et de la numération des hématies à l'hématimètre de Malassez. Nous n'avons trouvé chez les chevaux gourmeux qu'un seul cas où l'anémie était manifeste; il s'agissait d'une jument jeune atteinte d'un abcès gourmeux volumineux développé dans un ganglion mésentérique et qui devait entraîner la mort à brève échéance. Mais, à notre avis, cette anémie était bien plutôt due à l'anorexie qui durait depuis des semaines qu'à l'action d'une hémolysine streptococcique.

Dans l'infection expérimentale réalisée par l'inoculation intraveineuse d'une ou plusieurs doses mortelles de streptocoque gourmeux au lapin, nous avons constaté à l'autopsie, avec le classique aspect laqué du sang du cœur et des gros vaisseaux, des épanchements colorés en rose dans le péricarde, la plèvre, le péritoine relevant manifestement de l'hémolyse.

D'autre part, poursuivant des essais d'immunisation du lapin contre l'hémolysine, nous avons injecté à cet animal sous la peau des doses croissantes de centrifugat riche en hémolysine et dans la veine de l'émulsion de streptocoques vivants. Chez aucun de nos lapins d'expérience, nous n'avons observé d'hémoglobinurie.

Il semble donc, en résumé, qu'il y ait discordance entre l'effet de l'hémolysine *in vitro* où de très faibles quantités détruisent en 2 heures les globules rouges et *in vivo* où l'introduction de doses énormes d'hémolysine ne produit que rarement une lyse globulaire appréciable. Les humeurs et tissus de l'organisme seraient-ils capables de protéger les globules rouges contre l'action de l'hémolysine streptococcique? La deuxième partie de notre travail va nous éclairer sur ce point.

CHAPITRE II

DE L'ANTIHEMOLYSINE STREPTOCOCCIQUE

1° Aperçu historique

Existe-t-il une antihémolysine streptococcique? Si par antihémolysine on entend un anticorps développé dans l'organisme animal sous l'action répétée de l'hémolysine streptococcique considérée comme une vraie toxine, son existence est fortement mise en doute. Si on entend simplement, au contraire, le pouvoir empêchant qu'exerce vis-à-vis de l'hémolysine le sérum normal d'un grand nombre d'animaux, son existence est généralement admise.

Toutefois, sur ces deux opinions, l'unanimité des chercheurs n'est pas absolue.

BESREDKA (1901) constate que les sérums des animaux de laboratoire retardent l'hémolyse; le sérum de cheval à dose double de l'hémolysine l'empêche presque complètement.

L'immunisation ne développe aucune antilysine chez le lapin ou le mouton.

BRETON (1903) rapporte que quelques lapins traités par des doses croissantes d'hémolysine streptococcique ont donné un sérum tel que X gouttes annihilent l'action hémolytique d'une culture active. Le sérum normal de lapin n'aurait aucune action antihémolytique.

TCHITCHKINE (1906) trouve que le sang de lapins ayant reçu de la streptocolysine par voie buccale ne montre aucune différence avec le sang normal.

RUEDIGER (1907) ne réussit à provoquer l'apparition d'immun-antihémolysine ni chez le lapin, ni chez la chèvre, ni chez la poule.

MAC LEOD (1912) met en évidence la présence de petites

quantités d'antihémolysine dans le sérum humain, de cheval, de cobaye; il ne trouve pas d'antihémolysines artificielles dans le sérum des animaux immunisés, ni dans le sérum des individus ayant traversé une infection à streptocoque hémolytique.

BRAUN (1912) démontre que les sérums normaux de certains animaux (lapin, cobaye, cheval, homme) sont doués de propriétés antistreptolytiques, mais que ces propriétés ne sauraient être exaltées artificiellement par des injections répétées de streptolysine.

MAC LEOD et MAC NEE (1913) confirment que la streptolysine ne confère pas l'immunité, mais plutôt une légère hypersensibilité.

VON HELLENS (1913) constate que le sang de l'homme et de différents animaux qu'il a étudiés ne contient pas d'antistreptolysine et qu'il ne s'en produit pas à la suite d'injections (au cobaye et à la chèvre) de cultures hémolytiques de streptocoques.

WEINBERG et NASTA (1920) trouvent nul vis-à-vis de la streptocolysine le pouvoir antihémolytique du sérum de 150 chevaux neufs. D'autre part, sur 17 échantillons de sérum antistreptococcique de l'Institut Pasteur, 6 seulement se sont montrés nettement antihémolytiques (indice antihémolytique 200 à 500).

MEYER et JOSEPH (1923) admettent que le sérum normal de cheval ne contient pas d'antihémotoxine streptococcique; au contraire, ils arrivent à en développer de très actives (1/20 cc. et au-dessous neutralise 5 doses hémolytiques simples) par l'injection sous-cutanée au cheval de toxine à doses croissantes. Il faut reconnaître d'ailleurs que leur toxine est particulièrement active puisque 1/400^e de cc. suffit à l'hémolyse complète de 1 cc. de suspension d'hématies à 5 % et que la sélection de leurs streptocoques est particulièrement sévère puisque sur plus de 300 souches examinées, ils n'ont trouvé que cinq sources excellentes d'hémotoxine. Malheureusement, comme nous l'avons déjà signalé, ces auteurs ne donnent aucune indication sur les milieux de culture dont ils se sont servis.

LAVALLE (1927) constate que deux gouttes de sérum normal inactivé de lapin suffisent à neutraliser *in vitro* l'effet de 1 à 4 doses de filtrat hémolytique. Il échoue dans diverses tentatives de préparation chez le lapin d'immun-antihémolysine.

2° Mise en évidence et titrage

Nous avons recherché le pouvoir antihémolytique de différents sérums normaux et de sérums antistreptococciques de la façon suivante :

Dans un essai préliminaire, on détermine comme nous l'avons exposé précédemment la dose minima de culture de streptocoques débarrassée de ses corps microbiens par centrifugation rapide et prolongée, capable d'hémolyser complètement, en 2 heures, à 37°, 1 cc. d'émulsion à 10 % d'hématies lavées de cheval : dose minima hémolytique.

Ensuite, on met en contact dans des tubes à hémolyse, des doses croissantes du sérum à étudier avec deux doses minima hémolytiques en ayant soin de laisser 1 tube témoin sans hémolysine et 1 tube témoin sans sérum; on complète partout à égal volume avec de l'eau physiologique et on met à l'étuve à 37°, 30 minutes. Au bout de ce temps, on ajoute à chaque mélange 1 cc. de l'émulsion globulaire. On fait la lecture des résultats après 2 heures de séjour à l'étuve. Le dernier tube où l'hémolyse ne s'est pas produite indique la dose minima du sérum qui est capable de neutraliser deux doses d'hémolysine. Exemple :

TABLEAU N° 15

Numéro des tubes	Sérum n° 38	2 doses hémolytiques	Eau physiologique	Hématies 10 %	Lecture après 2 heures à 37°
	(cc.)	(cc.)		(cc.)	
1	1	0,3	0	1	0 pas d'hémolyse.
2	0,5	0,3	0,5	1	0 — —
3	0,2	0,3	0,8	1	0 — —
4	0,1	0,3	0,9	1	0 — —
5	0,05	0,3	0,95	1	— + traces d'hémolyse.
6	0,02	0,3	0,98	1	— ++ hémolyse incomplète.
7	0,01	0,3	0,99	1	— +++ hémolyse complète.
8	1	0	0,3	1	0 pas d'hémolyse.
9	0	0,3	1	1	+++ hémolyse complète.

Dans cet exemple, 1/10 cc. du sérum n° 38 a suffi à neutraliser les 2 doses minima hémolytiques; les deux tubes témoins 8 et 9 autorisent cette conclusion.

A cause de la durée assez longue de l'exposition à l'étuve à 37° : 1/2 heure, puis 2 heures, il est essentiel

d'utiliser l'hémolysine sous forme d'une culture débarrassée de ses germes de façon presque absolue. Si au lieu du centrifugat parfaitement clair on employait la culture totale, on constaterait qu'aucune dose de sérum n'est capable d'empêcher l'hémolyse parce que, au contact du sérum, la culture reprendrait une activité nouvelle et s'enrichirait fortement en hémolysine aux dépens du sérum même. Il est d'ailleurs assez curieux de constater que le sérum normalement antihémolytique se voit transformer en hémolysine par l'action du streptocoque vivant; la même substance est-elle en cause dans les deux cas?

3° Pouvoir antihémolytique des sérums normaux

Nous avons ainsi interrogé un certain nombre de sérums normaux de cheval; tous nous ont montré sensiblement le même pouvoir antihémolytique que le sérum n° 38, c'est-à-dire 0 cc. 1 comme dose minima active, quelle que soit d'ailleurs la souche de streptocoque gourmeux génératrice d'hémolysine. Les quelques différences observées sont de l'ordre des erreurs de mesure qu'on peut commettre avec une pipette graduée.

Nous avons de même recherché le pouvoir antihémolytique de sérums anticolibacillaire et antigangréneux polyvalent sans trouver de résultats sensiblement différents.

Ce pouvoir antihémolytique du sérum normal de cheval pouvait être le résultat d'une affection gourmeuse antérieure ou de contacts occultes et répétés avec le streptocoque. Aussi avons-nous comparé le sérum normal de cheval au sérum normal de divers animaux : bœuf, mouton, lapin, poule, et avec le sérum humain.

Tous ces sérums se sont montrés antihémolytiques à des doses variant entre 0 cc. 1 et 0 cc. 3; c'est le sérum de lapin qui s'est montré constamment le moins actif.

A noter qu'avec le sérum de poule, l'interprétation des résultats est rendue délicate par l'action hémolytique qu'exerce normalement ce sérum sur les hématies de cheval et de mouton, mais cette action est tardive, et en faisant la lecture dès que le tube témoin est complètement hémolysé, on se rend compte parfaitement du pouvoir

neutralisant qu'exerce le sérum de poule sur l'hémolysine streptococcique.

Ainsi, il apparaît bien difficile d'attribuer à des phénomènes d'immunité la présence de propriétés antihémolytiques dans le sérum normal de cheval.

Le chauffage à 56° une demi-heure n'apporte aucun changement au pouvoir antihémolytique du sérum normal.

4° Pouvoir antihémolytique des sérums antistreptococciques

Le sérum de chevaux hyperimmunisés contre des souches humaines de streptocoques selon la méthode du Professeur H. VINCENT, le sérum antistreptococcique de l'Institut Pasteur ne nous ont pas montré un pouvoir antihémolytique supérieur à celui du sérum normal vis-à-vis de l'hémolysine du streptocoque gourmeux.

Nous nous sommes adressé au sérum antigourmeux préparé, selon la méthode de BROCC-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN, au Laboratoire militaire de Recherches Vétérinaires avec des souches de streptocoques gourmeux dont quelques-unes ont servi à nos essais sur l'hémolysine.

En dehors de son activité thérapeutique reconnue dans la gourme du cheval, ce sérum protège à la dose de 2 cc. inoculée sous la peau, le cobaye contre 2 à 5 doses mortelles de culture de streptocoques et la souris à la dose de 0 cc. 5 contre 500 à 1.000 doses mortelles. Il est très riche en sensibilisatrices : 500 à 1.000 unités d'anticorps, comme l'ont montré BROCC-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN (1921). Enfin, il renferme aussi des agglutines : 1 p. 500 à 1 p. 1.000 (URBAIN, CARPENTIER ET CHAILLOT, 1929).

L'activité antihémolytique de 6 sérums provenant de 6 chevaux différents : (*Ravissant, Quirouitte, Tapette, Volney, Quartier-Maitre, Panache*) s'est montrée voisine de celle du sérum normal.

Nous avons tenté d'immuniser des lapins contre le streptocoque gourmeux et contre son hémolysine en procédant de la façon suivante : Quatre lapins ont été inoculés une fois par semaine et ont reçu : les 4 premières semaines, sous la peau, des doses progressives de culture de 8 heures centrifugée (l'activité hémolytique du centrifugat était véri-

fiée *in vitro*) : 5 cc., 10 cc., 20 cc., 50 cc.; les semaines suivantes, sous la peau, des doses encore croissantes de centrifugat hémolytique : 40 cc., 50 cc., 75 cc., 100 cc. et dans la veine des doses croissantes d'émulsion microbienne obtenue en diluant le culot de centrifugation de la culture dans un volume d'eau physiologique égal à celui du centrifugat : 1 cc., 2 cc., 5 cc., 10 cc. Les quatre lapins ont résisté sans aucun dommage aux inoculations de centrifugat, mais l'association du centrifugat au corps microbiens vivants s'est montrée sévère : un lapin est mort ayant reçu 5 cc. de dilution microbienne et 2 autres ayant reçu 10 cc. Un seul a survécu quoique assez amaigri; quinze jours après la dernière inoculation, on lui a prélevé 10 cc. de sang par ponction cardiaque et huit jours plus tard 10 autres cc. Le sérum n'avait acquis aucun pouvoir antihémolytique supplémentaire, il se comportait comme un sérum normal.

5° Essai de localisation du pouvoir antihémolytique parmi les composants du sérum

On sait que les antitoxines des sérums thérapeutiques sont liées à la pseudoglobuline de ces sérums. Il était intéressant de rechercher si l'antihémolysine streptococcique se comportait comme une antitoxine dans le fractionnement des albumines du sérum. Pour cela, nous nous sommes adressé à un sérum normal de cheval traité selon le procédé d'électro-dialyse mis en œuvre aux Laboratoires CLIN pour la purification des sérums thérapeutiques (1).

Ce procédé permet de séparer les protéines du sérum en trois factions : la sérum-albumine, la sérum-pseudoglobuline et la sérum euglobuline et d'obtenir chacune en solution aqueuse concentrée.

Nous avons ramené chacune de ces solutions à la concentration qu'avait la fraction protéique dans le sérum total ; nous les avons ensuite rendues isotoniques au sérum sanguin et de même pH. Nous avons ainsi des solutions de protéines qui se prêtaient à la mesure du

(1) A ce propos, nous tenons à remercier Mlle Chovet pour sa collaboration dans les opérations de fonctionnement des protéines.

pouvoir antihémolytique comme le sérum lui-même. Voici les résultats que nous avons obtenus :

Sérum normal total (6 gr., 42 % de protéines) ; dose minima antihémolytique : 0 cc. 1.

Solution de sérum-albumine (2 gr., 74 % d'albumine). Aucune propriété antihémolytique.

Solution de sérum-pseudoglobuline (2 gr., 38 % de pseudoglobuline). Aucune propriété antihémolytique.

Solution de sérum-euglobuline (1 gr., 30 % d'euglobuline) ; dose minima antihémolytique : 0 cc. 1.

Ainsi, tandis que sérum-albumine et sérum pseudoglobuline se montrent complètement inactives, l'euglobuline possède un pouvoir antihémolytique de même valeur que celui du sérum total. Donc l'antihémolysine ne se comporte pas comme une antitoxine.

D'autre part, nous avons constaté que le temps de contact de 30 minutes à 37° supposé indispensable à la neutralisation in vitro de l'hémolysine streptococcique par l'antihémolysine du sérum ou de la solution d'euglobuline n'était pas nécessaire et que ces deux substances exerçaient d'emblée leur pouvoir empêchant.

Leur action pouvait dès lors être rapprochée de celle de la lécithine signalée par MEADER et ROBINSON et par GORDON et STANSFIELD.

Or, on sait que le sérum contient entre autres lipides, à côté de la cholestérine libre ou estérifiée (1 gr. 50 par litre environ), de la lécithine (phosphoaminolipide, 1 gr. 30 à 1 gr. 60 par litre) (THOMAS). Ne pouvait-on penser que le sérum normal et notre solution d'euglobuline ne devaient leurs propriétés antihémolytiques qu'aux lipides contenus normalement dans le premier et entraînés comme impurétés dans la seconde.

Nous avons poursuivi quelques recherches à ce sujet. Nous avons d'abord voulu connaître quel était le pouvoir antihémolytique des deux principaux lipides du sang : lécithine et cholestérine.

La lécithine est capable, non seulement d'agir sur l'hémolysine des streptocoques, mais encore d'empêcher l'hémolyse par la saponine (BERNARD, 1923). La cholestérine empêche bien l'hémolyse par la saponine (MEYER, 1908, BOLDIN et FLANDIN, 1911, qui basent sur cette propriété une mesure approximative de la teneur du sérum

en cholestérine), mais elle n'a aucune action sur l'hémolyse streptococcique (MEADER et ROBINSON, 1920).

Nous avons employé de la lécithine d'œuf (BYLA) sous forme de solution laiteuse mais stable à 2 % dans de l'eau physiologique et nous avons constaté que 1/10 cc. de cette solution, soit 2 mmgr. de lécithine suffisaient à neutraliser deux doses hémolytiques d'hémotoxine streptococcique. C'est-à-dire que notre solution à 2 % possédait le même pouvoir antihémolytique que précédemment notre solution d'euglobuline à 1 gr. 30 %.

La cholestérine (BYLA) dont nous nous sommes servi provenait de substance nerveuse; nous n'avons pu en obtenir qu'une suspension colloïdale très instable en reprenant dans 100 cc. d'eau physiologique le précipité obtenu par l'évaporation dans le vide de 10 cc. d'éther ayant dissous 1 gr. de cholestérine. Cette suspension s'est montrée dépourvue de tout pouvoir antihémolytique. Nous reconnaissons que cette expérience perd beaucoup de sa valeur à cause de l'insolubilité de la cholestérine dans le sérum physiologique. Néanmoins, le résultat est conforme aux observations de MEADER et ROBINSON.

Nous avons ensuite traité 10 cc. de notre solution d'euglobuline par l'éther : 3 extractions successives dans chaque fois 20 cc. d'éther. Après élimination du solvant par décantation et évaporation dans le vide, la solution d'euglobuline avait conservé intégralement son pouvoir antihémolytique.

Cependant, les éthers d'extraction avaient enlevé à la solution de protéine certains composants que nous pûmes rassembler, après évaporation complète de l'éther dans le vide, sous forme d'une gouttelette huileuse, d'aspect colloïdal, facile à disperser dans 5 cc. d'eau physiologique, dispersion d'ailleurs très instable puisque, abandonnée pendant 24 heures, elle laissait surnager la majeure partie de la phase dispersée sous forme de légers flocons qui s'émulsionnaient complètement à la moindre agitation. Nous avons alors constaté que cette suspension colloïdale possédait des propriétés antihémolytiques, dose minima active : 0 cc. 4. Nous avons employé l'éther de préférence à tout autre solvant des lipides parce qu'il respecte les protéines; d'ailleurs, les phosphatides du sérum sont presque intégralement solubles dans l'éther (POSTERNAK).

Dans cet extrait éthéré antihémolytique, nous avons recherché qualitativement la cholestérine par la réaction colorée de LIEBERMANN adaptée par GRIGAUT et le phosphore par la réaction colorée de BELL et DOISY adaptée par BRIGGS (1922), ce phosphore ne pouvant être que le phosphore lipidique, puisque, d'une part tous les sels minéraux, donc tous les phosphates, avaient été éliminés par électrodialyse, et que d'autre part le sérum ne contient aucun autre phosphore organique (POSTERNAK). Nous avons fait les mêmes recherches dans les solutions de sérum-albumine, de pseudoglobuline, d'euglobuline épuisée par l'éther, Nous avons constaté que, effectivement, l'extrait éthéré et la solution d'euglobuline contenaient cholestérine et très peu de phosphore, tandis que les solutions d'albumine et de pseudoglobuline ne contenaient pratiquement ni l'un ni l'autre.

Enfin, si de la solution d'euglobuline nous précipitons les protéines par coagulation par la chaleur en milieu légèrement acide, la solution perd son pouvoir antihémolytique avec ses protéines.

De ces expériences, nous pouvons conclure que le sérum normal doit ses propriétés antihémolytiques : 1° aux lipides pour une part ; 2° pour une autre part à l'euglobuline, soit que cette protéine possède par elle-même le pouvoir antihémolytique, soit qu'elle le doive à sa combinaison avec les lipides, combinaison que ne peut rompre ni l'électro-dialyse, ni l'épuisement à l'éther. L'état des lipides dans la solution d'euglobuline serait semblable à celui que MACHEBŒUF (1929) a trouvé aux mêmes lipides retenus par la solution de sérum-albumine dans le fractionnement des protéines du sérum par le sulfate d'ammoniaque.

RAPPEL DES PRINCIPALES CONCLUSIONS

I

Le streptocoque gourmeux abandonne dans les milieux où on le cultive artificiellement une hémolysine très active si la composition du milieu est favorable.

A cet égard, le bouillon de bœuf ordinaire est meilleur que le bouillon Martin.

Le glucose améliore le bouillon Martin surtout à des taux très faibles : 1 à 2 p. 1.000.

Les milieux additionnés d'humeurs animales ont des valeurs inégales : ni l'ascite, ni le sang laqué n'augmentent sensiblement la valeur du bouillon Martin; par contre le sérum ajouté à ce bouillon assure une excellente production d'hémolysine. Le sérum frais est meilleur que le sérum vieilli, le sérum non chauffé meilleur que le sérum chauffé 1/2 heure à 56°. Dans ces différents milieux la production d'hémolysine n'est pas proportionnelle à la multiplication des corps microbiens.

L'aspect microscopique après coloration du streptocoque gourmeux est différent suivant les milieux dans lesquels il est cultivé.

La proportion de sérum à ajouter au bouillon Martin s'est montrée optima entre 30 et 50 %.

L'addition de glucose au bouillon-Martin-sérum à 40 % n'ajoute rien à ses qualités si elle est faite à moins de 3 p. 1.000; en plus grande proportion, elle entrave la production d'hémolysine.

L'acidité ionique du milieu de culture qui convient le mieux au développement de l'hémolysine est à rechercher aux environs immédiats de pH 7,5, quelle que soit par ailleurs la composition du milieu.

Le milieu de choix pour la mise en évidence des propriétés hémolytiques du streptocoque gourmeux est donc le suivant : bouillon Martin de pH 7,4 à 7,6 additionné de 40 % de sérum frais de cheval.

II

Dans un tel milieu, le pouvoir hémolytique maximum d'une culture est atteint vers la 10^e heure pour la majorité des streptocoques gourmeux; pour quelques autres, il n'est atteint que vers la 16^e heure.

III

Le pouvoir hémolytique absolu est variable selon les souches de streptocoques gourmeux mais il est sans relation avec le pouvoir pathogène. Par contre, le passage du streptocoque sur le lapin semble améliorer son pouvoir hémolytique.

IV

L'hémolysine streptococcique diffuse dans le milieu liquide de telle sorte que le centrifugat possède toutes les qualités hémolytiques de la culture totale tandis que le culot microbien en est dépourvu.

V

L'hémolysine streptococcique est filtrable dans une certaine mesure; la filtration sur bougie Chamberland L3 l'affaiblit considérablement.

VI

L'hémolysine résiste au chauffage de 1/2 heure à 56°. Il faut pour la détruire 2 heures à 60°, 4 heures à 50°. A des températures moindres, elle s'atténue lentement; à 37° elle est intacte après 6 heures mais affaiblie de moitié après 24 heures; à la température du laboratoire elle baisse en 24 heures de 1/3 environ; enfin, à la glacière, elle est encore intacte après 48 heures, mais ramenée au 1/3 de sa valeur après 7 jours.

VII

L'hémolysine affaiblie par la chaleur ou le vieillisse-

ment ne se laisse pas réactiver par le chlorure de calcium comme certaines autres hémotoxines.

VIII

Son effet s'exerce à égalité sur les hématies de cheval, de mouton, de bœuf, de lapin, de cobaye, d'homme. Par contre, les hématies de poule échappent complètement à son action.

IX

Aucun rapport entre l'action hémolytique *in vitro* et la même action *in vivo*. Sur le cheval gourmeux comme sur l'animal d'expérience le rôle pathogène hémolytique du streptococque n'est pas de premier plan.

X

Le sérum normal de cheval, de même que les sérums normaux de l'homme, du bœuf, du mouton, du lapin, de la poule, possèdent un certain pouvoir empêchant vis-à-vis de l'hémolysine du streptococque gourmeux.

XI

L'immunisation antistreptococcique appliquée sous des formes diverses n'augmente pas le pouvoir antihémolytique du sérum de cheval. Une tentative réalisée chez le lapin s'est montrée sans effet.

XII

Dans le fractionnement des protéines du sérum normal, l'antihémolysine streptococcique ne se comporte pas comme les antitoxines, tandis que ces dernières suivent le sort de la pseudoglobuline, l'antihémolysine a été retrouvée quantitativement avec l'aglobuline.

XIII

Le sérum normal semble devoir ses propriétés anti-hémolytiques : pour une part aux lipides du sérum, pour une autre part à l'euglobuline seule ou combinée à une fraction de ces lipides.

Vu :

Le Président de Thèse,
A. LEMIERRE.

Vu :

Le Doyen,
H. ROGER.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLETY.

BIBLIOGRAPHIE

- BARNES. — Classification of streptococci based on the correlation of results of hæmolytic, fermentative and precipiting tests. — *Journ. of inf. dis.*, t. XXV, juillet 1919, p. 47.
- BAUMANN. — *Münch. med. Woch.*, 1906, p. 25.
- BEITZKE et ROSENTHAL. — *Arb. path. Inst.*, Berlin, 1906, p. 349.
- BERNARD. — Influence de la lécithine sur l'action hémolysante de la saponine. — *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXIX, 23 juin 1923, p. 225.
- BESREDEKA. — De l'hémolysine streptococcique. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1901, p. 880.
Les hémolysines bactériennes. — *Bulletin de l'Institut Pasteur*, t. I, pp. 537 et 569.
- BIELING. — Methoden Zur Differenzierung der Streptokokken und Pneumokokken. — *Centr. f. Bakt., Orig.*, 86, n° 4, 1921, p. 257.
- BOIDIN et FLANDIN. — Pouvoir antihémolytique des sérums humains vis-à-vis de la saponine dans ses rapports avec le taux de la cholestérinémie. — *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXI, 11 nov. 1911, p. 402.
- BONDY. — *Monatsschr. f. Geburtsh. und Gynaek.*, t. XXIX, p. 553, 1909.
- BORDET. — Contribution à l'étude du sérum antistreptococcique. — *Ann. de l'Institut Pasteur*, t. II, 1897, p. 177.
- BOXER. — Ueber das Verhalten von Streptokokken und Diplokokken auf Blutnaehrböden. — *Centr. f. bakt. I, Orig.*, 40, 1906, p. 591.
- BRAUN. — Ueber das Streptolysin. — *Centralbl. f. Bakt. I, Orig.*, t. LXII, p. 383, 1912.
- BRETON. — De l'hémolysine produite par le streptocoque dans l'organisme infecté; sur l'obtention d'une antihémolysine streptococcique. — *C. R. Soc. Biol.*, t. LV, 4 juillet 1903, p. 886.
- BRIGGS. — A modification of the Bell — Doisy phosphate method. — *Journ. of Biol. Chem.*, V, 53, 1922, p. 13.
- BROCQ-ROUSSEU, FORGEOT et URBAIN. — Etudes sur le streptocoque gourmeux (4^e mémoire). — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. XXXVIII, juillet 1924, p. 598.
Le streptocoque gourmeux. — Monographie. — Edit. de la *Revue de Path. comp.*, Paris, 1925.
Sensibilisatrice due au Str. equi. — *C. R. de la Soc. Biol.*, 15 oct. 1921, p. 629.
- BROWN. — *Monograph of the Rockefeller Inst. f. Med. Research*, n° 9, 1919.
- CADEAC. — *Pathologie interne des animaux domestiques*, t. VI, p. 106, 2^e édit., 1913.
- CADIOT, LESBOUYRIES et RIES. — *Traité de médecine des animaux domestiques*, p. 879, 1925.

- CESARI, COTONI et LAVALLE. — Recherches sur l'hémolysine streptococcique. — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. XLI, 1927, p. 919.
- EHRlich. — *Berlin. Klin. Woch.*, 1898, n° 12, p. 273.
- FONTAINE et HUGUIER. — *Nouveau Dictionnaire Vétérinaire*, t. I, p. 700, 1924.
- GORDON. — Experiments on streptococcal hæmolysis and the antagonistic action of bile and bile salts. — *Brist. Journ. Exper. Path.*, t. VIII, février 1927, p. 38.
- GORDON et STANSFIELD. — Lecithin and streptococcal hæmolysin. — *Brit. Journ. of Exper. Path.*, t. X, n° 3, juin 1929.
- VON HELLENS. — Untersuchungen über Streptolysin. — *Centr. f. Bakt. I, Orig.*, 1913, t. LXVIII, p. 602.
- HALLENBERGER. — Die einwirkung chronischer Streptokokken infection auf das Blut des Kaninchens. — *Centr. f. Bakt., I, Orig.*, t. LXXXI, 31 mai 1918, p. 257.
- HECHT et HULLES. — Vergleichende untersuchungen über die Streptokokken des Erysipels. — *Zeitschr. f. Hyg.*, t. LXIII, p. 113, 1909.
- JUPILLE. — Du pouvoir hémolytique des Streptocoques. — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1911, p. 918.
- KERNER. — Experimenteller Beitrag zur Haemolyse und zur Agglutination der Streptokokken. — *Centr. f. Bakt. I, Orig.*, t. XXXVIII, 18 fév. 1905, p. 223, et 11 mars, p. 329.
- KNORR. — Experimentelle Untersuchungen über den Streptococcus longus. — *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XIII, 1893, p. 427.
- KRAUSS et CLAIRMONT. — *Wiener Klin. Wochenshr.*, 1900, n° 3, p. 49.
- DE KRUIF et IRELAND. — Streptolysin. — *Journ. of inf. dis.*, t. XXVI, avril 1920, p. 285.
- LAVALLE. — *Recherches sur l'hémolysine streptococcique*. — Thèse Doct. Pharm., 1927, Paris.
- LEULIER, SEDAILLAN et CLAVEL. — Etudes sur la toxine diphtérique. Analyse chimique et analyse biologique. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, t. XI, 1929, n° 10, p. 413.
- VON LINGELSHÉIM. — *Habilitations Schr.*, Marburg, 1899.
- LUBENAU. — Haemolytische Faehigkeit einzelner pathogener Schizomyceten. — *Centr. f. Bakt.*, t. XXX, 1901, pp. 356 et 402.
- MACHEBŒUF. — Recherches sur les phosphoaminolipides et les stéridés du plasma et du sérum sanguins. — *C. R. Ac. des Sciences*, t. CLXXXVIII, 1929, p. 109.
- MAC LEOD. — On the hæmolysin produced by pathogenic streptococci and the existence of antihæmolysin in the sera of normal and immunised animals. — *Journ. of path. and bact.*, t. XVI, janvier 1912, p. 321.
- MAC LEOD et MAC NEE. — On the anæmia produced by the injection of the hæmolysin obtained from streptococci and on the question of naturel and acquired immunity to streptolysin. — *Journ. of path. and bact.*, 1913, t. XVII, p. 524.
- MADSEN. — Ueber Tetanolysin. — *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XXXII, p. 214, 1899.
- MARMOREK. — Le streptocoque et le sérum antistreptococcique. — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1895, t. IX, p. 593.
- MEADER et ROBINSON. — Biological and physical properties of the hæmotoxin. — *Journ. of exp. Med.*, t. XXXII, p. 639, déc. 1920.

- MEYER. — Ueber den Einfluss einiger Eiweisskörper und andere Kolloide auf die Haemolyse. — *Archiv. f. Hyg.*, t. LXV, 1908, p. 392.
- MEYER et JOSEPH. — Streptokokkeninfection und Antistreptokokkenserum. — *Med. Klinik*, 1923, n° 24.
- MAC NEILL. — Studies on the oxidation and reduction of immunological substances. — *Journ. Exp. Med.*, t. XLIV, août 1926, pp. 199 et 227.
- NEISSER et WECHSBERG. — Ueber das Staphylotoxin. — *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XXXI, 1901, p. 299.
- NOCARD et LECLAINCHE. — *Maladies microbiennes des animaux*, 3^e édit., 1903, t. II, p. 279.
- POSTERNAK. — Sur la répartition du phosphore dans le sérum et les globules rouges du sang. — *C. R. Ac. Sciences*, 1926, t. CLXXXII, p. 724.
- PRIBAM. — *Haemotoxine und Antihæmotoxine der Bakterien. — Handbuch der Pathogenen Mikroorganismen*, 2^e édit., p. 1328.
- PULVERTAFT. — Study of pathologic effects of streptococcal toxin and haemolysin on the rabbit. — *The lancet*, t. CCXVII, n° 5529, août 1929.
- RUEDIGER. — The production and nature of streptococcolysine. — *Journ. of Amer. Med. Association*, 17 oct. 1903.
- The cause of green coloration bacterial colonies in blood agar plates. — *Journ. of Inf. Dic.*, 3, 1906, p. 663.
- SCHLESINGER. — Experimentelle Untersuchungen über das Haemolysin der Streptokokken. — *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XLIV, 28 oct. 1903, p. 428.
- SCHOTTMÜLLER. — *Arb. path. Inst. Berlin*, 1906, p. 349.
- TCHITCHKINE. — De l'action du streptocoque et de sa lysine introduits par voie buccale. — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, t. XX, 1906, p. 499.
- THALLMANN. — Streptokokkenkrankungen in der Armee, Einteilung der Streptokokken und ihre Bekaempfung. — *Centr. f. Bakt. I, Orig.*, 56, 1910, p. 248.
- THOMAS. — *Cours de Chimie biologique*, II^e partie, 1929.
- UMENO. — On the relation between the development of the hæmolytic streptococci of the horse and the hydrogen ion concentration of the medium. — *Journ. Japan. Soc. of Veter. Sc.*, t. IV, juin 1925, n° 2, p. 113.
- URBAIN, CARPENTIER et CHAILLOT. — La séro-agglutination du Streptocoque gourmeux. — *C. R. Soc. Biol.*, t. CII, 30 nov. 1929, p. 736.
- H. VINCENT. — Sur l'hémolysine du B. Megatherium. — *C. R. Soc. Biol.*, t. LXVII, 17 juillet 1909, p. 195.
- A. VINCENT, DOPTER et BILLET. — Influence du Chlorure de Calcium sur les hémolysines bactériennes. — *C. R. Soc. Biol.*, t. LX, 3 mars 1906, p. 460.
- WALBUM. — Studien über Toxinbildung. — *Zeitschr. Immunit.*, I, Orig., t. III, 15 juillet 1909, p. 70.
- WOLLMAN et GRAVES. — Hémolyse bactérienne et protéolyse. — *C. R. Soc. Biol.*, t. XCI, p. 50, 1924.
- WEINBERG et NASTA. — Rôle des hémolysines dans l'intoxication microbienne. — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1920, p. 690.
- ZANGEMEISTER. — *Deutsche Med. Wochenschr.*, 1909, n° 10, p. 18.

TABLE DES MATIERES

<i>Avant-propos.</i>	13
<i>Introduction.</i> — Hémolyse et Hémolysines.	15
CHAPITRE I. — <i>De l'Hémolysine streptococcique.</i>	17
1° Aperçu historique.	17
2° Choix d'une méthode de mise en évidence et de titrage.	18
A. Milieux solides.	18
B. Milieux liquides.	21
3° Choix d'un milieu de culture.	27
A. Composition du milieu.	27
a) Bouillons simples.	27
b) Action du glucose.	28
c) Action des humeurs animales.	30
d) Influence des proportions de bouillon et de sérum.	32
e) Action simultanée du sérum et du glucose.	34
B. Réaction du milieu.	35
4° De quelques propriétés de l'hémolysine.	39
A. Rapport entre pouvoir hémolytique et âge de la culture.	39
B. Pouvoir hémolytique de différentes souches.	41
C. Filtrabilité.	42
D. Conservation de l'hémolysine. Action de la chaleur.	44
E. Réactivation de l'hémolysine atténuée.	45
F. Influence de la nature des hématies.	46
G. Origine, nature et mode d'action de l'hémolysine.	47
H. Action de l'hémolysine sur l'animal vivant.	49
CHAPITRE II. — <i>De l'antihémolysine streptococcique.</i>	53
1° Aperçu historique.	53
2° Mise en évidence et titrage de l'antihémolysine.	55
3° Pouvoir antihémolytique des sérums normaux.	56
4° Pouvoir antihémolytique des sérums antistreptococciques.	57
5° Essai de localisation du pouvoir antihémolytique parmi les composants du sérum.	58
<i>Rappel des principales conclusions.</i>	63
<i>Bibliographie.</i>	67

